

Herstellung und Charakterisierung tetraetherlipidhaltiger Lipoplexe und Lipopolyplexe als neuartige Vehikel für die orale Gentherapie

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Konrad Engelhardt
aus **Bad Soden am Taunus**

Marburg/Lahn 2017

Erstgutachter: **Prof. Dr. Udo Bakowsky**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Cornelia Keck**

Eingereicht am **01.11.2017**

Tag der mündlichen Prüfung am **13.12.2017**

Hochschulkennziffer: 1180

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Januar 2013 bis Juli 2017 durchgeführt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Summary.....	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 Gentherapie	1
1.1.2 Somatische Gentherapie und Keimbahntherapie	6
1.1.3 <i>In-vivo</i> und <i>ex-vivo</i> Gentransfer	7
1.1.4 Viraler Gentransfer	8
1.1.5 Nicht-viraler Gentransfer	8
1.1.6 Lipide und Liposomen.....	10
1.1.7 Polymere.....	12
1.1.8 Reportersysteme	13
1.2 Membranlipide aus Archaeen	15
1.2.1 <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	16
1.2.2 <i>Thermoplasma acidophilum</i>	16
1.3 Tetraetherlipide	17
1.3.1 Native Tetraetherlipide	18
1.3.2 Halbsynthetische Tetraetherlipide	19
2 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software.....	22
3.2 Methoden	27
3.2.1 Extraktion und Aufreinigung der Tetraetherlipide.....	27
3.2.2 Extraktion der Rohlipide (TEL)	27
3.2.3 Extraktion und Aufreinigung der polaren Lipidfraktion (PLFE)	28
3.2.4 Extraktion und Aufreinigung von hydrolysierten Tetraetherlipiden (hGDNT und hGDGT)	29

3.3 Synthese von halbsynthetischen Tetraetherlipiden	30
3.4 Herstellung der Liposomen, Lipoplexe und Lipopolyplexe	31
3.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	33
3.6 Zetapotential.....	35
3.7 Rasterkraftmikroskopie	36
3.8 Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM)	38
3.9 Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM).....	39
3.10 NMR-Spektroskopie	39
3.11 IR-Spektroskopie.....	39
3.12 Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)	40
3.13 Dünnschichtchromatographie	40
3.14 MTT-Assay	41
3.15 LDH-Assay	42
3.16 Transfektion	43
3.17 Bestimmung des Proteingehalts (Pierce BCA Protein Assay)	45
3.18 Interkalationsassay	46
3.19 Agarose-Gelelektrophorese	47
4 Ergebnisse	48
4.1 Isolierung und Aufreinigung von Tetraetherlipiden	48
4.1.1 TEL (Soxhlet-Extrakt).....	48
4.1.2 Polare Lipidfraktion E (PLFE).....	50
4.1.3 Hydrolysierte Tetraetherlipide (hGDNT und hGDGT)	51
4.1.4 Halbsynthetisches Tetraetherlipid (MI-0907)	52
4.2 Analytik von Tetraetherlipiden	54
4.2 Physikochemische Charakterisierung von Liposomen	58
4.3 Testung der pH-Stabilität	61
4.4 Stabilität von Liposomen in Lungensurfaktant.....	64
4.5 Interkalationsassay	65

4.6 Transfektionsstudien mit Lipoplexen.....	66
4.7 Transfektionsstudien mit Lipopolyplexen	68
4.8 Toxizitätsstudien	69
4.9 Heparin-Assay	72
4.10 Morphologische Aspekte.....	73
4.10.1 Rasterkraftmikroskopie.....	73
4.10.2 Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM)	76
4.10.3 Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM).....	77
5 Diskussion.....	78
6 Zusammenfassung und Ausblick	83
7 Anhang	84
7.1 Literaturverzeichnis.....	84
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	96
7.3 Abbildungsverzeichnis.....	99
7.4 Tabellenverzeichnis	102
7.5 Publikationen.....	103
7.5.1 Referierte Publikationen	103
7.5.2 Tagungsbeiträge	104
7.6 Danksagungen	105
7.7 Erklärung	107

Zusammenfassung

Die Gentherapie bietet ein großes Potential für die Behandlung von schweren chronischen Erkrankungen wie z.B. Krebs oder Erbkrankheiten. Hierbei werden nicht nur die Symptome der Krankheiten behandelt, sondern man versucht defekte Gene zu ersetzen. Mit sogenannten Genvektoren (viral oder nicht-viral) werden dabei Gene in menschliche Zellen eingeschleust. Ein Genvektor muss nicht nur eine hohe Transfektionseffizienz besitzen, sondern auch eine geringe Toxizität und hohe Patientencompliance aufweisen. Ein Gentherapeutikum zur oralen Anwendung, das eine hohe Stabilität gegenüber dem sauren pH-Wert im Magen hat, würde diese Kriterien am besten erfüllen.

Ein vielversprechender Ansatz, um Genvektoren herzustellen, die in sauren pH-Werten stabil bleiben, stellt die Nutzung von Tetraetherlipiden der Archaeen dar. Archaeen bilden neben den Bakterien und Eukaryoten eine der drei Domänen zellulärer Lebewesen. Sie sind an extreme Milieubedingungen angepasst, z.B. wachsen sie bevorzugt bei +80 °C (hyperthermophil), in stark konzentrierten Salzlösungen (halophil) oder bei niedrigen pH-Werten (acidophil). Der Grund für diese außergewöhnliche Stabilität liegt darin, dass die Zellmembran der Archaeen aus Tetraetherlipiden aufgebaut ist. Im Gegensatz zu eukaryotischen Membranlipiden besitzen Tetraetherlipide keine Ester- sondern Etherbindungen. Des Weiteren durchspannen Tetraetherlipide die Membran vollständig und ordnen sich nicht zu einer Doppelmembran an.

In der vorliegenden Arbeit wurden Tetraetherlipide aus den gefriergetrockneten Biomassen von Archaeen mittels Soxhlet-Extraktion extrahiert. Eine darauffolgende Aufreinigung fand an einer Kieselgelsäule statt. Die extrahierten Lipidfraktionen beschränkten sich auf TEL (Rohlipide), PLFE (polare Lipidfraktion E), hGDNT (hydrolysiertes Glycerol-Di-Alkyl-Nonitol-Tetraetherlipid) und hGDGT (hydrolysiertes Glycerol-Di-Glycerol-Tetraetherlipid). Zudem wurde ein neuartiges Tetraetherlipid (MI-0907) mit positiv geladener Kopfgruppe synthetisiert. Alle fünf Tetraetherlipide erhielt man als dunkelbraune bzw. hellgelbe waxartige Massen mit Ausbeuten von 1,9 - 46,89 % (bezogen auf die Ausgangsmasse).

Für die Herstellung von Liposomen wurden Tetraetherlipide und konventionelle Lipide wie z.B. DPPC (1,2-Di-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin), CH (Cholesterol) oder DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammoniumpropan) in verschiedenen molaren Verhältnissen in einem organischen Lösungsmittel miteinander gemischt. Durch Verdampfung des

Lösungsmittels bildete sich ein dünner Lipidfilm, der durch Zugabe einer wässrigen Pufferlösung in eine liposomale Suspension überführt wurde. Die so hergestellten Liposomen zeigten Durchmesser von 101 - 351 nm und PDI-Werte von 0,2 - 0,4. Liposomen mit günstigen Parametern bzgl. Größe und PDI-Wert stellten die Formulierungen hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol), MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) und hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) dar. Sie wurden in weiteren Experimenten in Pufferlösungen mit pH-Werten von 2 - 9 inkubiert und bzgl. der Änderung des Durchmessers nach einem Scoring System (--- bis +++) bewertet. Die oben genannten Formulierungen zeigten minimale Veränderungen bzgl. der Durchmesser und PDI-Werte.

Die Komplexierung der positiv geladenen Formulierungen mit pDNA führte zu Lipoplexen, die ebenfalls eine hohe Stabilität bei pH-Werten von 2 - 9 zeigten.

Die Transfektionseffizienzen der Formulierungen lagen ca. 30 - 40 % unter den Referenzsubstanzen (25kDa-bPEI oder DOTAP). Zur Verbesserung der Transfektionseffizienzen, bildete man Komposite aus Liposomen, Polymer und pDNA, sogenannte Lipopolyplexe. Als Liposomen wurden die oben genannten Formulierungen eingesetzt. Die Transfektionseffizienz lag bei Lipopolyplexen bis zu 50 % über den Referenzsubstanzen. Zudem wiesen Lipopolyplexe in Toxizitätsversuchen wie z.B. LDH-Assay eine um ca. 75 % reduzierte Toxizität im Vergleich zu einfachen Polyplexen auf. Die besondere Stabilität der tetraetherlipidhaltigen Lipopolyplexe wurde in einem Heparin-Assay ermittelt, wobei der Stabilitätseffekt deutlich höher war als für einfache Polyplexe.

Die morphologischen Besonderheiten von Lipoplexen konnte mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht werden. Hierbei war zu erkennen, dass sich pDNA um Liposomen windet und der Aufbau multilamellar erfolgt, d.h. mehrere Lipidschichten sind übereinander angeordnet und bilden einen „zwiebelartigen“ Aufbau der Komplexe.

Bei Lipopolyplexen, die Durchmesser von 138 nm bis 156 nm annehmen, ist ein Polyplexxern von einer ca. 4 nm dicken Lipidschicht ummantelt.

Die erfolgreiche Extraktion und Aufreinigung von Tetraetherlipiden aus Archaeen, ist für die Herstellung von Genvektoren eine wichtige Grundlage. Qualitätsbestimmende Kriterien der gewonnenen Lipoplexe und Lipopolyplexe wie reduzierte Toxizität, Stabilität im sauren pH-Milieu und erhöhte Transfektionseffizienz legen nahe, dass sich Genvektoren auf der Basis von Tetraetherlipiden der Archaeen für die orale Gentherapie eignen sollten.

Summary

Gene therapy offers great potential for the treatment of severe chronic diseases such as cancer or hereditary diseases. It not only treats the symptoms of the disease, but also attempts to replace defective genes. Genes are introduced into human cells using so-called gene vectors (viral or non-viral). The structural and functional requirements for a suitable gene vector are manifold. It must not only have a high transfection efficiency, but also a low cell toxicity and high patient compliance. A gene therapeutical medicine for the oral application, which has a high stability against the acidic pH value in the stomach, would meet these criteria.

A promising approach to produce gene vectors that remain stable under acidic pH conditions is the use of tetraether lipids from the archaea. Archaea form one of the three domains of cellular organisms, along with bacteria and eukaryotes. They are adapted to extreme environmental conditions, e. g. they grow preferably at +80 °C (hyperthermophil), in highly concentrated salt solutions (halophilic) or at low pH-values (acidophil). The reason for this extraordinary stability is that the cell membrane of the archaea is composed of tetraether lipids. In contrast to eukaryotic membrane lipids, tetraether lipids do not contain ester but ether bonds. Furthermore, tetraether lipids span the entire cell membrane and do not arrange themselves into a bilayer membrane.

In the present work, tetraether lipids were extracted from the freeze-dried bio masses of archaea using soxhlet extraction. A subsequent purification was performed on a silica column. The lipid fractions extracted were limited to TEL (raw lipids), PLFE (polar lipid fraction E), hGDNT (hydrolyzed glycerol-di-alkyl-nonitol tetraether lipid) and hGDGT (hydrolyzed glycerol-di-glycerol tetraether lipid). In addition, a novel tetraether lipid (MI-0907) with a positively charged head groups was synthesized. All five tetraether lipids were obtained as dark brown or pale yellow wax-like masses with yields of 1.9 - 46.89 % (referring to the initial mass).

For the preparation of liposomes, tetraether lipids and conventional lipids like DPPC (1,2-di-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), CH (cholesterol) or DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane) were mixed in different molar ratios in an organic solvent. Evaporation of the solvent produced a thin lipid film, which then was hydrated with an aqueous buffer solution resulting in a liposomal suspension. The liposomes prepared in this way showed diameters of 101 - 351 nm and PDI values of

0.2 - 0.4. Liposomes with favourable parameters regarding size and PDI-value provided the formulations hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol), MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) and hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol). They were incubated in buffer solutions in further experiments with pH-values ranging from 2 - 9 and were evaluated with regard to the change of the diameter according to a scoring system (--- to +++). The liposomal formulations showed minimal changes in diameter and PDI values. The complexation of the positively charged formulations with pDNA led to lipoplexes, which also showed high stability at pH values of 2 - 9.

The transfection efficiencies of the formulations were approximately 30 - 40 % below the reference substances like 25kDa-bPEI or DOTAP. In order to improve the transfection efficiencies, liposomes, polymers and pDNA composites, so-called lipopolyplexes, were prepared. The above mentioned formulations were used as liposomes, which had a high pH stability. The transfection efficiency of lipopolyplexes was up to 50 % above the reference substances. In addition, lipopolyplexes in toxicity tests such as LDH assay showed a reduced toxicity of about 75 % compared to simple polyplexes. The special stability of the tetraether lipid-containing lipopolyplexes was determined in a heparin assay, whereby the stability effect was higher than for simple polyplexes.

The morphological characteristics of tetraether lipid-containing lipoplexes could be investigated by atomic force microscopy. It was found that pDNA is wrapped around liposomes and the structure is multilamellar, i. e. several lipid layers are arranged on top of each other and form a typical "onion-like" structure of the complexes. Lipopolyplexes, which have diameters of 138 nm to 156 nm, have an additional lipid layer of approx. 4 nm thickness.

The successful extraction and purification of tetraether lipids from archaea is an important basis for the preparation of gene vectors. Quality-determining criteria of the lipoplexes and lipopolyplexes obtained, such as reduced toxicity, stability in the acidic pH environment and increased transfection efficiency suggest that gene vectors based on archaeal tetraether lipids should be suitable for oral gene therapy.

1 Einleitung

1.1 Gentherapie

Im Erbgut aller Organismen treten spontan oder durch Umwelteinflüsse ständig Veränderungen bzw. Fehler der DNA auf [1, 2]. Diese Veränderungen werden meist von der Zelle selbst repariert [3]. Kommt es jedoch zu einer Akkumulation dieser Fehler und zu einer unvollständigen Reparatur, kann dies weitreichende Folgen haben. Durch die Expression fehlerhafter Gene kann es zu einem unkontrollierten Zellwachstum (z.B. Tumore) kommen.

Eine vielversprechende Therapie zum Beheben der Defekte stellt die Gentherapie dar. Sie dient im Allgemeinen zur Behandlung von chronischen und vor allem tödlichen Erkrankungen und ist ein relativ neues Behandlungsfeld im Bereich der Pharmazie/Medizin. Eine Therapie auf Genebene hat ein hohes Potential chronische und schwerwiegende Krankheiten zu lindern oder sogar zu heilen. Jedoch bedarf es auch eines wachsamen Auges auf mögliche Nebenwirkungen. Rückschläge in den 90er Jahren sorgten daher für eine zeitweilige Abflachung des Forschungsinteresses [4-6]. Jedoch sind in den letzten Jahren die Anzahl der klinischen Studien im Bereich Gentherapie deutlich angestiegen (Abbildung 1.1). Dies beruht vor allem auf einem tieferen Verständnis von krankheitsverursachenden Genen sowie effektiveren Methoden des Gentransfers.

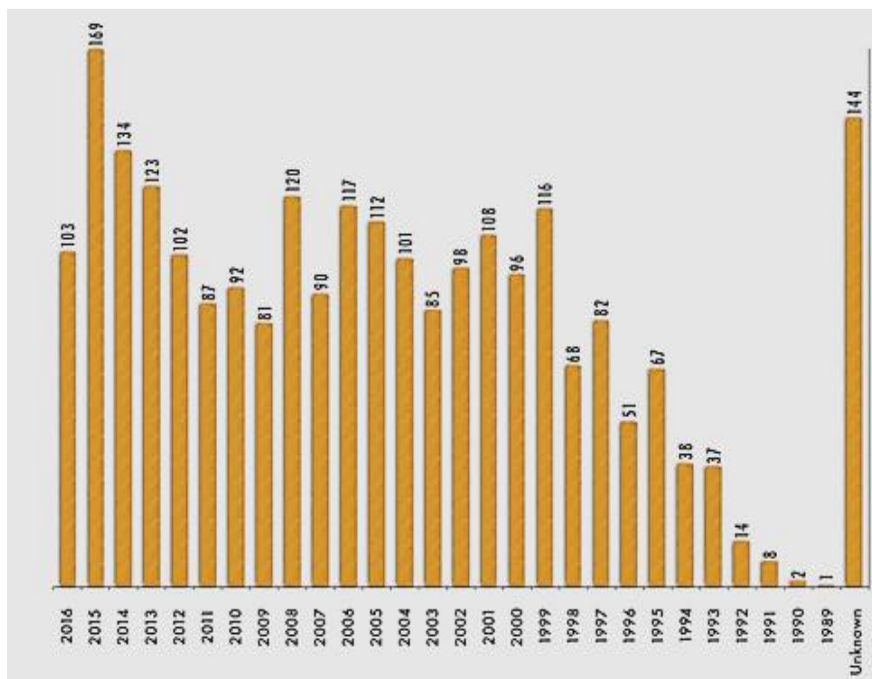


Abbildung 1.1 Anzahl der klinischen Studien im Bereich Gentherapie [7].

Durch den Anstieg der Lebenserwartung weltweit und die damit einhergehende allgemeine demographische Entwicklung der Weltbevölkerung, nahmen bestimmte Krankheiten überproportional zu. Die bekanntesten Alterserkrankungen mit den höchsten wirtschaftlichen und humanitären Konsequenzen sind Krebs [8], Alzheimer-Demenz, und Typ 2 Diabetes. Gerade für diese Krankheiten werden ständig neue und innovative Therapieformen benötigt. Die Forschungen auf dem Gebiet der Gentherapie zur Krebsbehandlung sind besonders intensiv wegen des großen Marktpotentials. Mehr als die Hälfte der Gentherapien zielen auf die Indikation von Krebsbehandlungen ab (Abbildung 1.2).

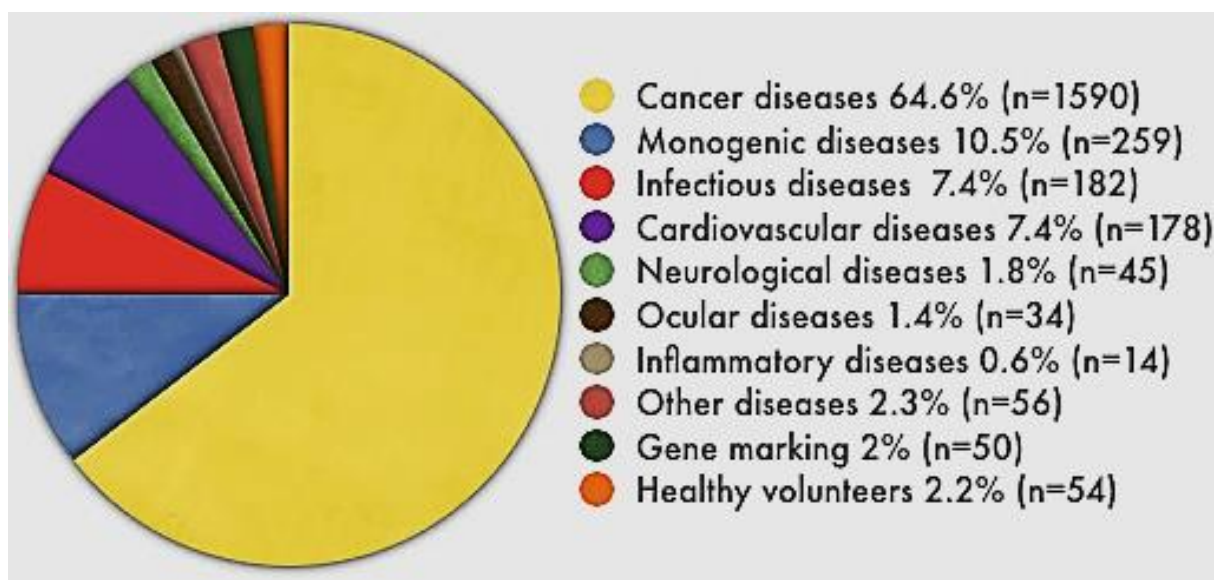


Abbildung 1.2 Prozentualer Anteil der Indikationen im Bereich Gentherapie im Jahr 2017 [9].

Die Durchführung einer Gentherapie hat den Zweck, angeborene oder erworbene fehlerhafte Gene zu ersetzen, zu korrigieren oder auszuschalten. Zur Einschleusung der Gene in Zellen bedarf es Genvektoren, die das gesunde Gen möglichst effektiv und spezifisch in die Zellen bringen können. Hierbei spielen vor allem Adeno- und Retroviren (virale-Genvektoren) eine herausragende Rolle (Abbildung 1.3). Beide Arten können, abhängig vom Serotyp, beim Menschen ernsthafte Erkrankungen auslösen. Beim Einsatz dieser Viren im Bereich der Gentherapie werden jedoch definierte Abschnitte des viralen Genoms ersetzt, so dass es zu keiner weiteren Replikation der Viren im menschlichen Körper kommen kann.

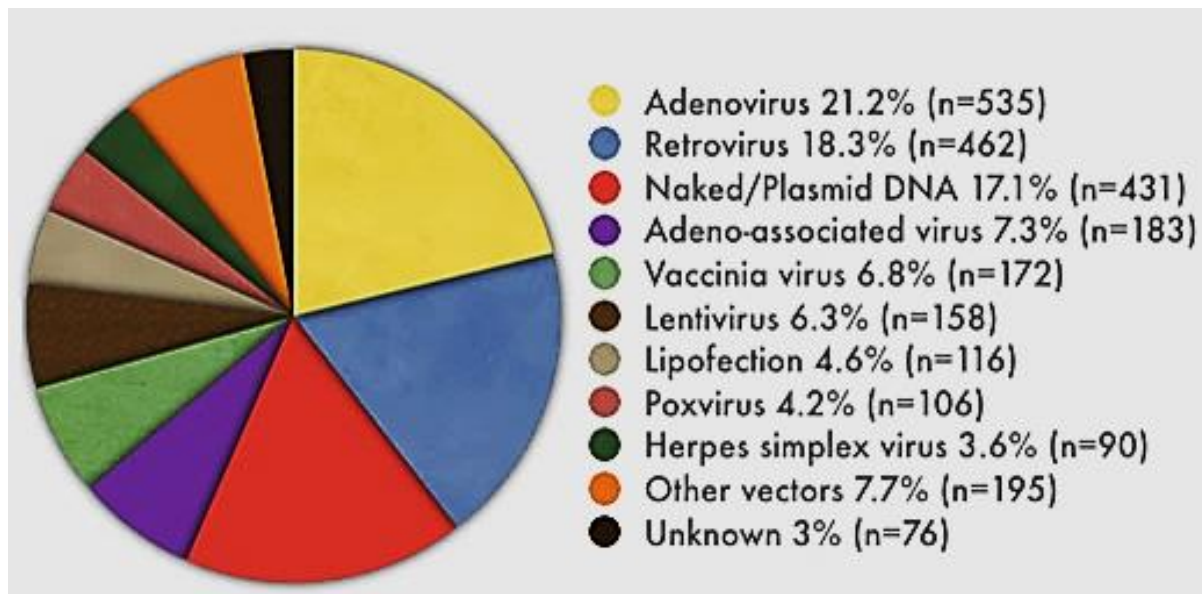


Abbildung 1.3 Prozentualer Anteil verwendeter Genvektoren in Gentherapiestudien im Jahr 2017 [10].

Die Gentherapie beschränkt sich nicht nur auf den Eingriff in nukleäre DNA, sondern sie ermöglicht ebenfalls durch Einbringen von verschiedenen Arten von Genen, die Genexpression bzw. den Zelltod (Abbildung 1.4). Zudem umfasst die Gentherapie auch die indirekte Stimulierung des körpereigenen Immunsystems [11-13], z.B. durch die Expression kodierter Antigene an der Zelloberfläche (Abbildung 1.5). Ein Großteil der Gentherapeutika stellen ebenfalls Antisense-Gene dar. Sie führen zellintern zu einer Blockade der mRNA [14, 15]. Dies verursacht letztendlich eine verminderte Proteinproduktion innerhalb der Zelle (Abbildung 1.6).

Generell unterscheidet man Gentransfer auf somatischer Ebene und auf Keimbahnebene. Beim somatischen Gentransfer werden lediglich die Körperzellen genetisch beeinflusst wohingegen im Gentransfer auf Keimbahnebene die genetische Manipulation über weitere Generationen weitergegeben wird [16]. Zusätzlich gibt es Techniken, die es ermöglichen Zytostatika direkt in Zellen exprimieren zu lassen [17], was zu einer erheblichen Reduktion von Nebenwirkungen führt.

Die Entwicklung von Gentherapeutika sowie deren Markteintritt ist ein langfristiges und teures Projekt, so dass bis heute lediglich fünf Gentherapeutika zugelassen wurden. Das Gentherapeutikum „Strimvelis™“ wird zur Behandlung des Immundefektes „ADA-SCID“ angewendet [18]. Bei dieser Erkrankung ist das körpereigene Immunsystem nicht voll funktionsfähig und es besteht eine hohe Infektanfälligkeit, die meist tödlich verläuft. Weiterhin

wird das Gentherapeutikum „LuxturnaTM“ zur Behandlung eines seltenen Gendefekts, der zur frühzeitigen Erblindung führt, eingesetzt. In China wurde ebenfalls das Gentherapeutikum „GendicineTM“, zur Behandlung von Kopf-Hals Tumoren, ohne eine klinische Phase III zugelassen [19, 20]. In Europa und USA ist es nicht zugelassen, da die Regulierungsbehörden EMA und FDA strengere Regeln haben.

Eine weitere innovative Gentherapie ist die sogenannte CAR-T Zelltherapie. In diesem Bereich wurden bereits zwei Medikamente („KymriahTM“ und „YescartaTM“) von der amerikanischen Regulierungsbehörde zugelassen und befinden sich zurzeit im Zulassungsprozess der europäischen Regulierungsbehörde. Hierbei werden T-Zellen, die eine Gruppe der Lymphozyten darstellen, dem Körper durch Apherese entnommen und außerhalb (*ex-vivo*) mittels viraler Gentransfektion behandelt. Bei erfolgreicher Transfektion wird der chimäre Antigenrezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert. Dieser Rezeptor erkennt das CD19 Antigen, das von B-Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Bei erfolgreicher Transfektion und Vermehrung werden die modifizierten Zellen dem Körper mittels Infusion verabreicht. Diese Art von Gentherapie hat vor allem bei schwer therapierbaren malignen hämatologischen Erkrankungen wie ALL und NHL Wirkung gezeigt [21-23]. Die Behandlung von soliden Tumoren, wie z.B. Glioblastomen oder Pankreaskarzinomen mittels CAR-T Zelltherapie wird zurzeit ebenfalls in klinischen Studien getestet. Die CAR-T Zelltherapie ist ein großer medizinischer Fortschritt bei der Behandlung vieler Krebsarten. Jedoch sind die langfristigen Folgen noch unbekannt.

Um ein Gen in eine menschliche Zelle zu schleusen, gibt es eine Reihe von Techniken, die sich bezüglich der Effizienz stark unterscheiden. Der Transfer von DNA, die einen therapeutischen Zweck erzielen soll, wird entweder physikalisch oder chemisch durchgeführt. Zu den physikalischen Methoden zählen Elektroporation, Mikroinjektion sowie der Beschuss der Zelle mit Partikeln [24-26]. Bei diesen Methoden wird die Zelle direkt verändert, z.B. durch Anlegen eines elektrischen Feldes an der Zelle kommt es zu einer vorübergehenden Permeabilität der Zellmembran. Dies führt zu einer vereinfachten Einschleusung von Fremd-DNA in das Zellinnere. Bei einer Mikroinjektion wird die Zelle zunächst unter einem Mikroskop angesaugt. Anschließend wird mit einer feinen Spritze das genetische Material direkt in den Zellkern injiziert. Zu den chemischen Methoden zählen vor allem die Transfektion mittels Kalziumphosphat und DEAE-Dextran. Hier wird zuerst ein DNA-Phosphat bzw. DNA-DEAE-

Komplex gebildet. Dieser haftet auf der Zelloberfläche und wird letztendlich durch Endozytose in die Zelle aufgenommen [27, 28].

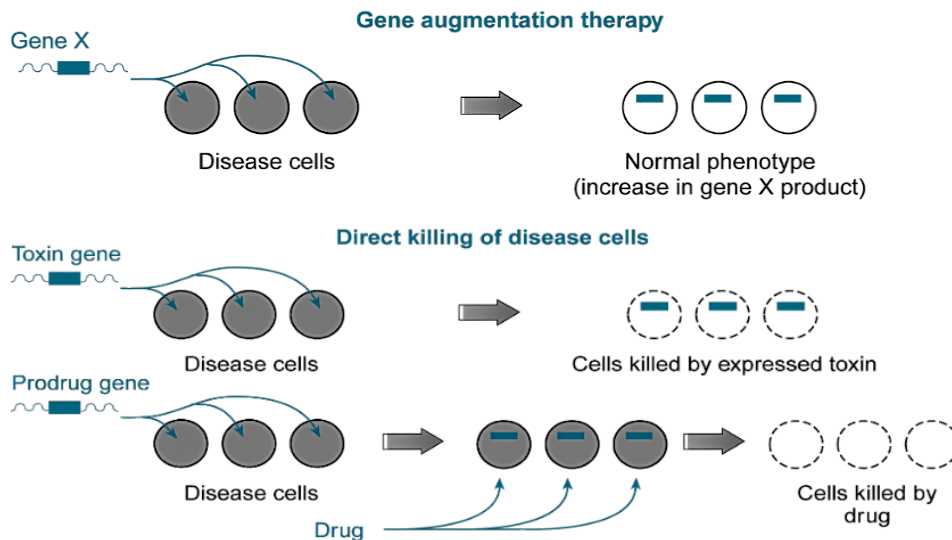


Abbildung 1.4 Strategien der Gentherapie (1), Balajthy *et al.* [29].

Verschiedene Arten von Fremdgenen können in krankhafte Zellen eingeschleust werden. Das eingebrachte Gen kann dafür sorgen, dass ein bestimmtes Genprodukt vermehrt produziert wird, um einen Mangel entgegenzuwirken (oben). Außerdem können Fremdgene den Zelltod (Apoptose) induzieren (mitte). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass erst ein Pro-Pharmakon als Gen in die Zelle geschleust wird und dies zusammen mit einem weiteren Medikament eine zelltoxische Wirkung herbeiführt (unten).

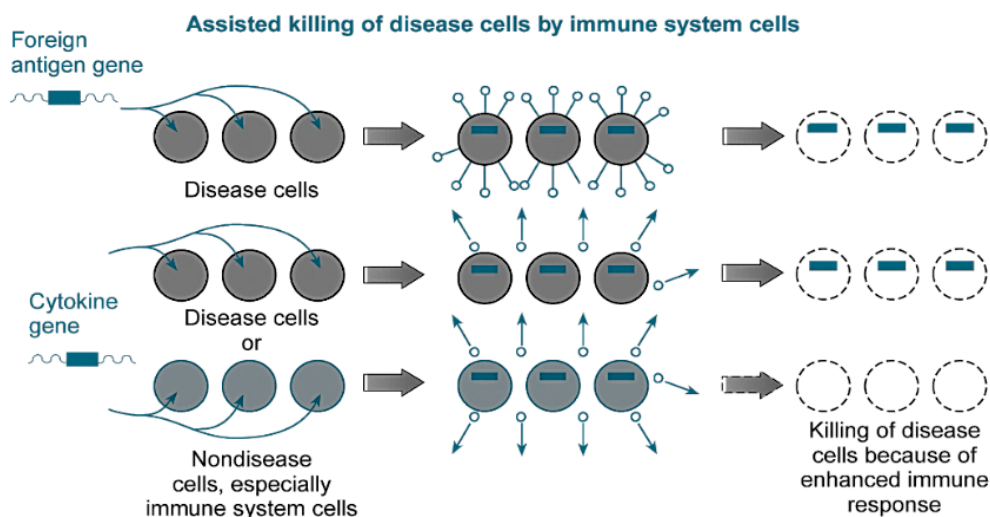


Abbildung 1.5 Strategien der Gentherapie (2), Balajthy *et al.* [29].

Eine indirekte Methode um krankhafte Zellen zu eliminieren besteht darin, ein kodiertes Antigen in die Zellen zu bringen. Das Gen sorgt für eine Expression eines Antigens an der Zelloberfläche. Die körpereigene Immunabwehr wird somit stimuliert und sorgt für eine Elimination der Zellen (oben). Neben den Antigenen, können auch kodierte Zytokine exprimiert werden, die wie Antigene eine ähnliche Wirkung auf das Immunsystem haben (unten).

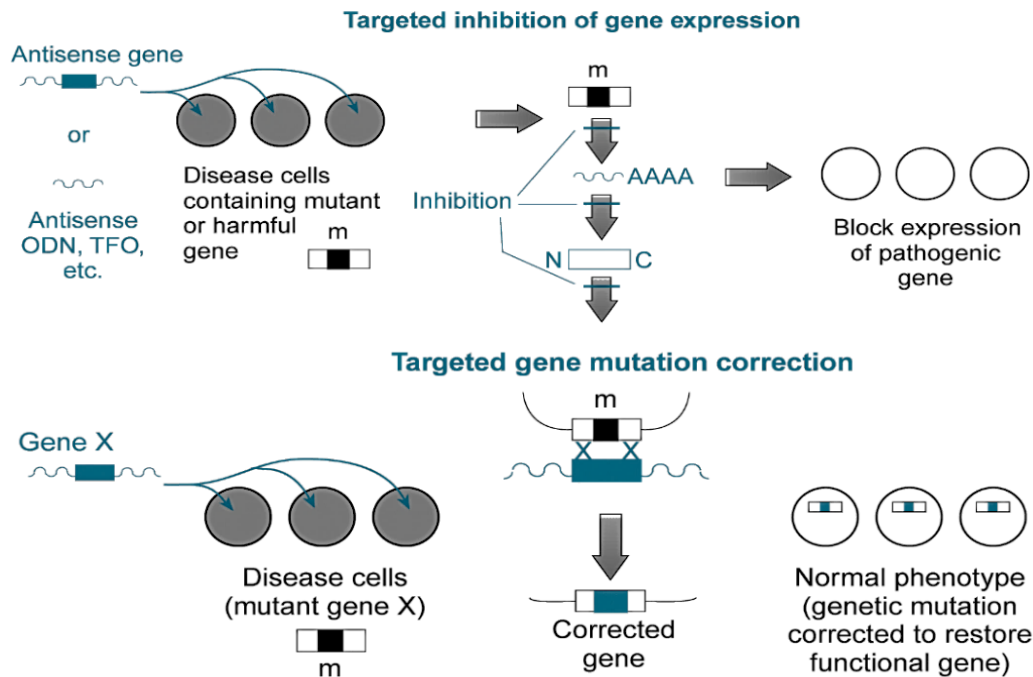


Abbildung 1.6 Strategien der Gentherapie (3), Balajthy *et al.* [29].

Antisense-RNA führt dazu, dass überwiegend zellinterne mRNA konsequent gehemmt wird (oben). Dies verhindert die Expression entsprechender Proteinprodukte. Ebenso können mutierte Gene korrigiert werden (unten).

1.1.2 Somatische Gentherapie und Keimbahntherapie

Die Gentherapie lässt sich prinzipiell in zwei Anwendungsgebiete einteilen:

(i) Somatische Gentherapie und (ii) Keimbahntherapie. Die somatische Gentherapie umfasst die genetische Veränderung von Körperzellen (somatische Zellen), die nicht an die nächstfolgenden Generationen weitergegeben wird. Die genetischen Auswirkungen beschränken sich lediglich auf das Individuum. Die effektive Einschleusung des Vektors und das Erreichen einer effizienten Expression des Genes stellen die größten Herausforderungen dar [32, 33].

Bei der Keimbahntherapie wird das Erbgut in den Keimzellen verändert. Die Zellen umfassen die Vorläufer der Ei- und Samenzellen, befruchtungsfähige Ei- und Samenzellen sowie Zellen im frühen embryonalen Entwicklungsstadium. Im Gegensatz zu der somatischen Gentherapie werden bei der Keimbahntherapie die genetischen Veränderungen von Generation zu Generation weitergegeben [34, 35]. Solche Keimbahntherapien werden lediglich im Tiermodell angewendet und sind aufgrund des deutschen Embryonenschutzgesetzes (§5) an Menschen verboten [36].

1.1.3 In-vivo und ex-vivo Gentransfer

Methodisch lässt sich die Gentherapie in *in-vivo* (innerhalb des Körpers) und *ex-vivo* (außerhalb des Körpers) einteilen. Bei der *in-vivo* Methode wird weiterhin zwischen dem lokalen und dem systemischen Gentransfer unterschieden. Bei dem lokalen Gentransfer wird der Vektor direkt in das betroffene Gewebe gespritzt [37] wohingegen beim systemischen Gentransfer der Vektor in das Blut injiziert wird [38]. Hierbei ist es wichtig, dass der Vektor eine hohe Spezifität besitzt, d.h. er sollte nur die betroffenen Zellen erreichen.

Der *ex-vivo* Gentransfer ist im Gegensatz zu dem *in-vivo* Gentransfer aufwändiger. Hierbei werden dem Patienten erst körpereigene Zellen (autologe Zellen) entnommen und im Labor mit entsprechenden Vektoren (viral oder nicht-viral) genetisch manipuliert. Die erfolgreich modifizierten Zellen werden aussortiert, vermehrt und anschließend wieder in den Körper reinjiziert (Abbildung 1.7) [39, 40]. Dieses Prinzip wird bei der CAR-T Zelltherapie angewendet.

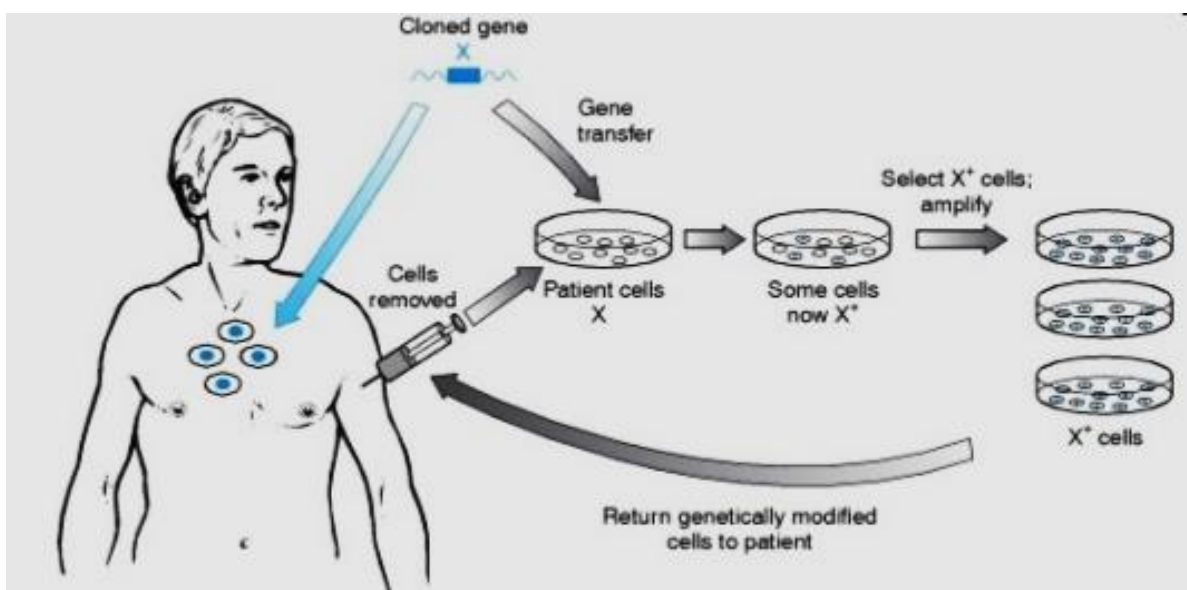


Abbildung 1.7 Gentherapie *in-vivo* und *ex-vivo* [41].

Während bei der *in-vivo* Methode ein Gen direkt in den menschlichen Organismus gebracht wird (z.B. durch geeignete Genvektoren) werden bei der *ex-vivo* Methode autologe Körperzellen entnommen und im Labor mit einem entsprechenden Gen manipuliert. Die erfolgreich genetisch manipulierten Zellen werden aussortiert, vermehrt und wieder in den menschlichen Organismus gebracht.

1.1.4 Viraler Gentransfer

Der virale Gentransfer beschränkt sich auf die Einschleusung von Fremdgenen in die Zelle mit Hilfe von Viren. Eine andere Bezeichnung hierfür ist Transduktion oder Infektion. Die eingesetzten Viren unterscheiden sich bzgl. Größe des Transgens, Virus-Titers, Integrationsfähigkeit in das Genom und Expressionsstärke. Im Vergleich zu einfachen Methoden, wie z.B. Kalziumphosphatfällung (Präzipitation eines DNA-Phosphat-Komplex auf der Zellmembran mit anschließender Endozytose) ist die Genexpression höher. Demgegenüber steht jedoch ein erhöhtes Potential an Nebenwirkungen (Tab. 1). Es kann z.B. passieren, dass sich Viren-DNA in menschliche DNA integriert (Insertionsmutagenese) [42]. Außerdem kann es zu einer Reaktivierung von Viruspartikeln kommen, was letztendlich zu einer starken und potentiell tödlichen Immunantwort führen kann [43].

Ein viraler Gentransfer ist außerdem mit erhöhtem technischen Aufwand und Sicherheitsvorkehrungen verbunden. Zusätzlich ist das Verfahren kostenaufwändiger [44].

1.1.5 Nicht-viraler Gentransfer

Der nicht-virale Gentransfer beschränkt sich hauptsächlich auf die Einbringung von DNA oder RNA mit Hilfe von Genvektoren in Form von Lipoplexen (Komplexe aus Liposomen und DNA), Polyplexen (Komplexe aus Polymer und DNA) oder Lipopolyplexen (Komposite aus Liposomen und Polyplexen). Ein Vorteil des nicht-viralen Gentransfers ist u.a. die fehlende Immunogenität (Ausnahme: Chitosan [45]) im Vergleich zum viralen Gentransfer [46]. Dies hat den Vorteil, dass eine Mehrfachapplikation durchgeführt werden kann. Der technische Aufwand sowie die Sicherheitsvorkehrungen sind deutlich geringer als beim viralen Gentransfer. Der vollständige Mechanismus ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Grunde genommen kommt es zu einer elektrostatischen Annäherung der Genvektoren an die negativ geladene Zelloberfläche. Die negative Ladung der Zelloberfläche kommt durch bestimmte Oberflächenproteine wie z.B. Sialinsäure oder Integrine zustande. Nach Adhäsion des Genvektors an die Zelloberfläche, stülpt sich die Zellmembran ein und es bildet sich ein Endosom, das den Komplex enthält [47, 48]. Die Befreiung der pDNA aus dem Inneren des Endosoms findet im Falle von Polyplexen durch den sogenannten „Protonenschwammeffekt“ [49] statt oder im Falle von Lipoplexen z.B. durch die Ausbildung einer hexagonalen Phase [50]. Das Ablesen der DNA (Transkription) durch bestimmte Enzyme findet im Zytosol oder im Zellkern der Zelle statt (Abbildung 1.8).

Tab. 1 Vor- und Nachteile des viralen und nicht-viralen Gentransfers.

Genvektor	Vorteile	Nachteile
Viral	<ul style="list-style-type: none">• Integration in das Genom• Effizienter Gentransfer• Stabile Genexpression	<ul style="list-style-type: none">• Aufwändige Produktion• Hohe Kosten• Geringe Selektivität• Pathogenität• Mutagenese Karzinogenese• Induktion des Immunsystems• Fremdengröße beschränkt
nicht-viral	<ul style="list-style-type: none">• Niedrige Kosten• Hohe Sicherheit• Keine Beschränkung der Fremdengröße• Hohe Ausbeuten	<ul style="list-style-type: none">• Ineffizienter Gentransfer in den Zellkern• Teilweise toxische Effekte• Geringe Stabilität der Lipoplexe im Organismus

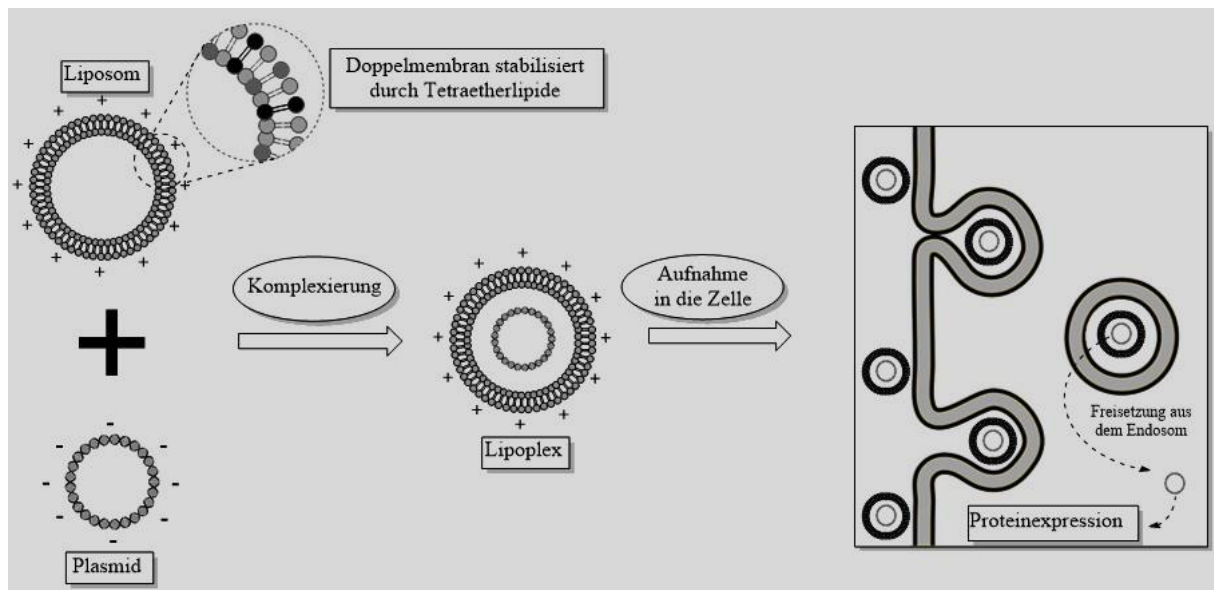
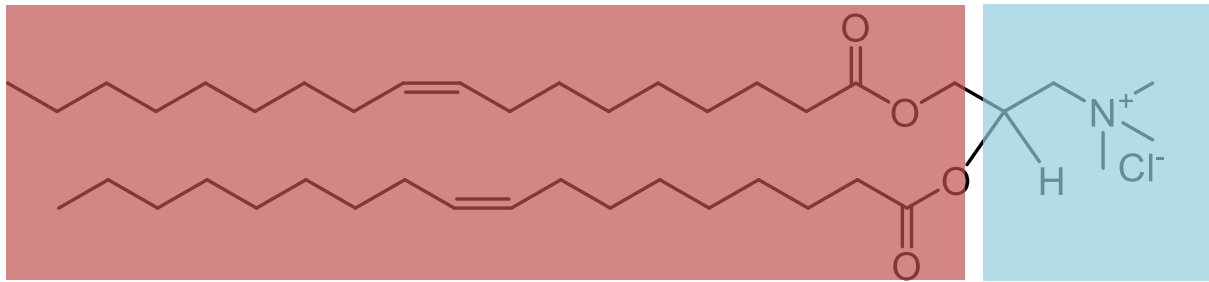


Abbildung 1.8 Grundlegender Mechanismus des nicht-viralen Gentransfers.

Positiv geladene Liposomen werden in einem definierten Verhältnis (N/P-Verhältnis) mit einem Plasmid-DNA (pDNA z.B. pCMV-luc) inkubiert. Das N/P-Verhältnis gibt hierbei das molare Verhältnis von Stickstoff-Atomen im Lipid zu Phosphat-Atomen im Plasmid an. Durch elektrostatische Wechselwirkungen entstehen nach 20 min positiv geladene Lipoplexe. Hierbei wird das Plasmid von positiv geladenen Lipiden umhüllt. Durch die Wahl des optimalen N/P-Verhältnisses entstehen Wechselwirkungen, die weder zu stark, noch zu schwach sein sollen. Im weiteren Verlauf, kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Lipoplexen und Zelloberfläche, die aufgrund bestimmter Oberflächenstrukturen negativ geladen ist. Die Aufnahme der Lipoplexe erfolgt durch Endozytose, wobei es zu einer Membraneinstülpung kommt und die Lipoplexe durch Einschluss in einem Endosom vorliegen. Letztendlich kommt es zur Freisetzung der „wackelig“ gebundenen Plasmid-DNA, die innerhalb des Zellkerns transkribiert wird und zu einer Proteinexpression führt.

1.1.6 Lipide und Liposomen

Das Grundgerüst von Lipiden besteht aus einer großen polaren Kopfgruppe sowie einer unpolaren Alkylkette, dem sogenannten „Schwanzteil“ (Abbildung 1.9). Im wässrigen Milieu lagern sich Lipide zu größeren Aggregaten, Liposomen zusammen und bilden eine Suspension [51, 52]. Die Liposome können je nach Herstellungsart als multilamellare Vesikel (z.B. durch einfaches Schütteln der wässrigen Suspension) oder unilamellare Vesikel (z.B. durch mehrmalige Extrusion durch eine Polycarbonatmembran definierter Porengröße) vorliegen (Abbildung 1.10). Für die Gentransfektion eignen sich vor allem Lipide, die eine positiv geladene Kopfgruppe haben. Somit können sie mit negativ geladener pDNA komplexieren. Beispiele hierfür sind DOTAP, DOTMA oder DC-Cholesterol [53, 54]. Weiterhin sind sogenannten Helferlipide wie z.B. Cholesterol und DOPE nützlich, da sie sowohl die Fusion mit der Zellmembran als auch den Austritt aus dem Endosom durch Ausbildung einer hexagonalen Phase begünstigen (Abbildung 1.11) [55].



DOTAP

Abbildung 1.9 Schematischer Aufbau eines kationischen Lipids zur Gentransfektion.

Der hydrophobe Schwanz (rot) besteht aus Kohlenwasserstoffketten (z.B. aliphatische Fettsäurereste oder Cholesterolderivaten) und einem hydrophilen Kopfteil (blau), der positiv geladen ist. Die positive Ladung ist essentiell um negativ geladene pDNA zu komplexieren. Die Fähigkeit der Selbstorganisation der Lipide zu Liposomen wird durch den Packungsparameter (P) bestimmt. Hierbei wird das hydrophobe Volumen des Lipids (V) zu dem Produkt aus der Querschnittsfläche des hydrophilen Kopfes (a) und Länge der hydrophoben Kette (l) ins Verhältnis gesetzt. Liegt dieser Wert bei 0,5 - 1 kommt es zur Ausbildung von Liposomen [56].

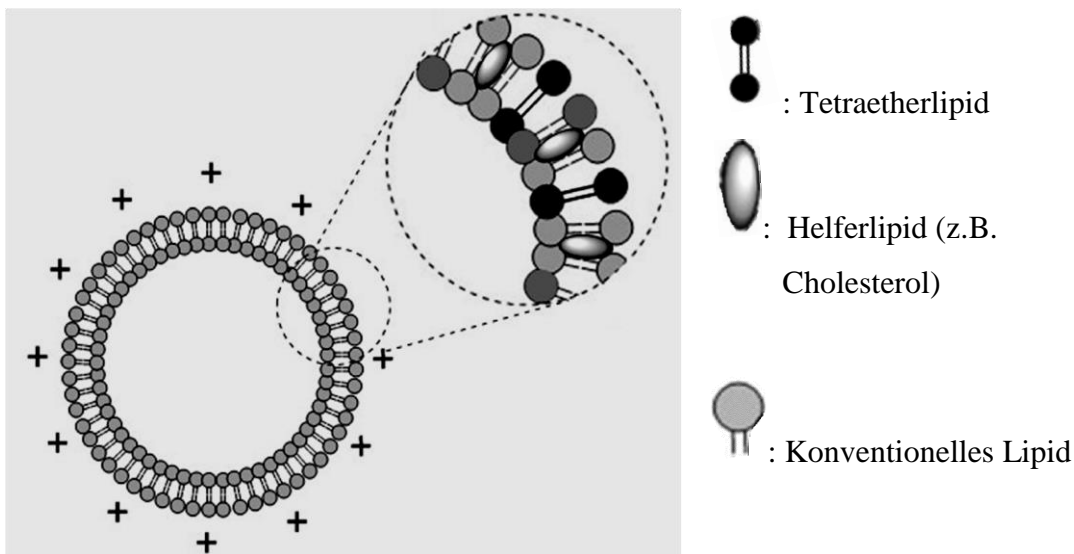


Abbildung 1.10 Modell eines unilamellaren tetraetherlipidhaltigen Liposoms im Querschnitt.

Durch die charakteristische Struktur von Lipiden sind sie in der Lage in wässrigem Milieu, Liposomen zu bilden. Die so entstehenden sphärischen multilamellaren Strukturen können durch Extrusion oder Ultraschallbehandlung in unilamellare Liposomen überführt werden. Die hydrophilen Köpfe der Lipide ragen nach außen, während nach innen die hydrophoben Schwänze der beiden Schichten aneinandergrenzen. Der innere Raum des Liposoms besteht wiederum aus wässrigem Milieu und den hydrophilen Kopfgruppen. Zwischen den Lipiden können außerdem Helferlipide oder Lipide zur Stabilisierung (Tetraetherlipide) eingelagert werden. Tetraetherlipide (schwarz) durchspannen die gesamte Membran während konventionelle Lipide (grau) eine Doppelmembran bilden.

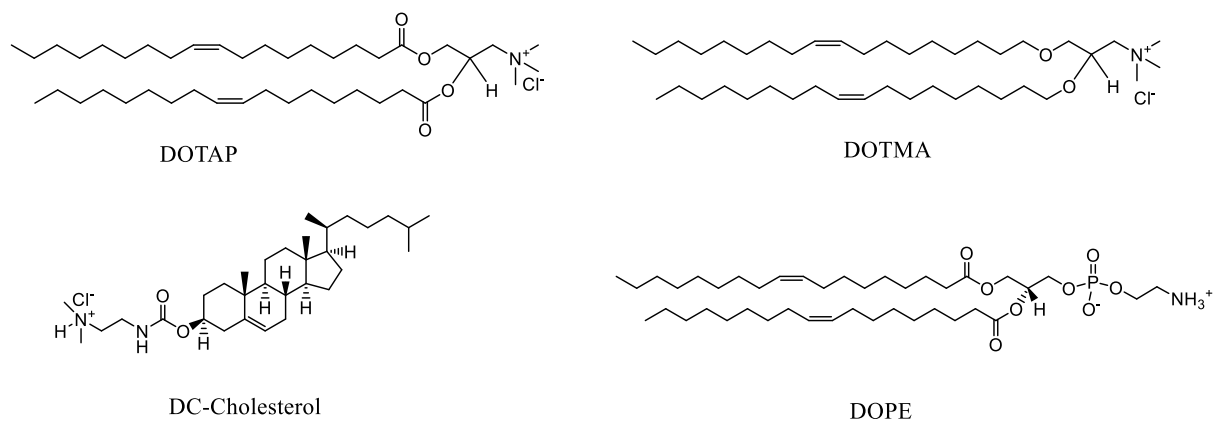


Abbildung 1.11 Lipide und Helferlipide für die Herstellung von Lipoplexen für den Gentransfer. Die hier aufgeführten monokationischen Lipide DOTAP, DOTMA und DC-Cholesterol als Einzelkomponenten oder in Kombination mit Helferlipiden wie DOPE sind die Lipide der „ersten Generation“. Sie sind kommerziell erhältlich und werden vielfach in der Forschung angewendet.

1.1.7 Polymere

Als Polymere dienen hauptsächlich stickstoffreiche, verkettete Grundgerüste, die bei physiologischem pH-Wert ein positives Zetapotential aufweisen, um negative geladene pDNA komplexieren zu können. Das Polymer wird vor Verwendung zuerst in einem wässrigen Medium erwärmt bis es gelöst vorliegt. Der pH-Wert dieser Lösung wird anschließend auf 7,4 eingestellt. Durch Komplexierung mit pDNA kommt es aufgrund der elektrostatischen Annäherung von positiv geladenen Polymerketten und negativ geladener pDNA zu einzelnen Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 60 - 80 nm [57, 58]. Diese Partikel können aufgrund der positiven Überschussladung an negativ geladene Oberflächenstrukturen der Zelle adhären und werden durch eine Membraneinstülpung in die Zelle aufgenommen [59].

In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzsubstanz 25kDa-bPEI verwendet. Es handelt sich hierbei um ein verzweigtes Polyethylenimin Polymer, das ein Molekulargewicht von 25kDa hat (Abbildung 1.12). Weitere Polymere, die bei Gentransfektionen eingesetzt werden, sind z.B. lineares Polyethylenimin mit unterschiedlichen Molmassen [60], Polylysin sowie Endgruppen modifizierte Polymere wie auch Lipid/Polymer Hybride [61].

Im Gegensatz zu Polylysin zeigt Polyethylenimin eine gesteigerte Freisetzung des Genmaterials aus dem Endosom aufgrund des sogenannten „Protonenschwammeffektes“. Bei dieser Hypothese wird angenommen, dass der Grund für die hohe Gentransfektionsrate, die enorme Pufferkapazität von Polyethylenimin ist. Es kommt wahrscheinlich zu einer Hemmung von lysosomalen Nukleasen sowie zu einer Veränderung der Osmolarität, was zu einer Anschwellung und Aufbrechen des Endosoms führt.

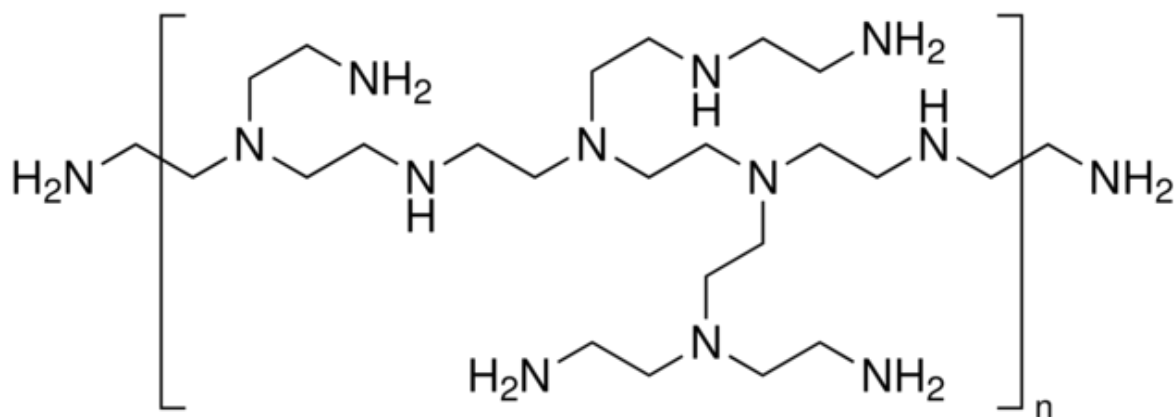


Abbildung 1.12 Strukturformel von Polyethylenimin (verzweigt).

Das kationische Polymer Polyethylenimin wird häufig aufgrund seiner exzellenten Transfektionseffizienz in Zellversuchen eingesetzt und dient als Referenzsubstanz. Durch die hohe Dichte an kationischer Ladung kommt es zur Kondensation mit Nukleinsäuren (pDNA), wodurch das genetische Material vor Degradation der Nukleasen geschützt wird. Innerhalb des Moleküls wiederholen sich Ethylenimin-Einheiten ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), die jeweils eine Masse von 43 Da haben.

1.1.8 Reportersysteme

Um eine Gentransfektion quantifizieren zu können, müssen entsprechende Reportergene eingesetzt werden. Diese führen dazu, dass letztendlich ein Enzym intrazellulär exprimiert wird. Durch die anschließende Zelllyse kann das Enzym mit einem entsprechenden Substrat versetzt werden. Die darauffolgende Enzym-Substrat-Reaktion kann durch Fluometrie erfasst werden. Reportergene sind in sogenannten Plasmidvektoren eingebaut und kommerziell erhältlich, wie z.B. das Luciferase Plasmid (pCMV-luc) [62]. Andere Beispiele für Reportergene sind z.B. das LacZ-Gen [63], das Chloamphenicol-acetyltransferase [64] und das Grün-fluoreszierende Protein [65]. Die Methode in dieser Arbeit beschränkt sich lediglich auf die Enzymreaktion des Luciferaseproteins mit dem dazugehörigen Substrat D-Luciferin. Der grundlegende Mechanismus (Abbildung 1.14) ist die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin [66]. Gemessen werden die Lichtquanten, die direkt proportional zur Luciferaseaktivität sind und anschließend auf den Proteingehalt normiert werden. Der Proteingehalt wird im Anschluss an das Transfektionsexperiments z.B. mit einen Pierce BCA Protein Assay bestimmt.

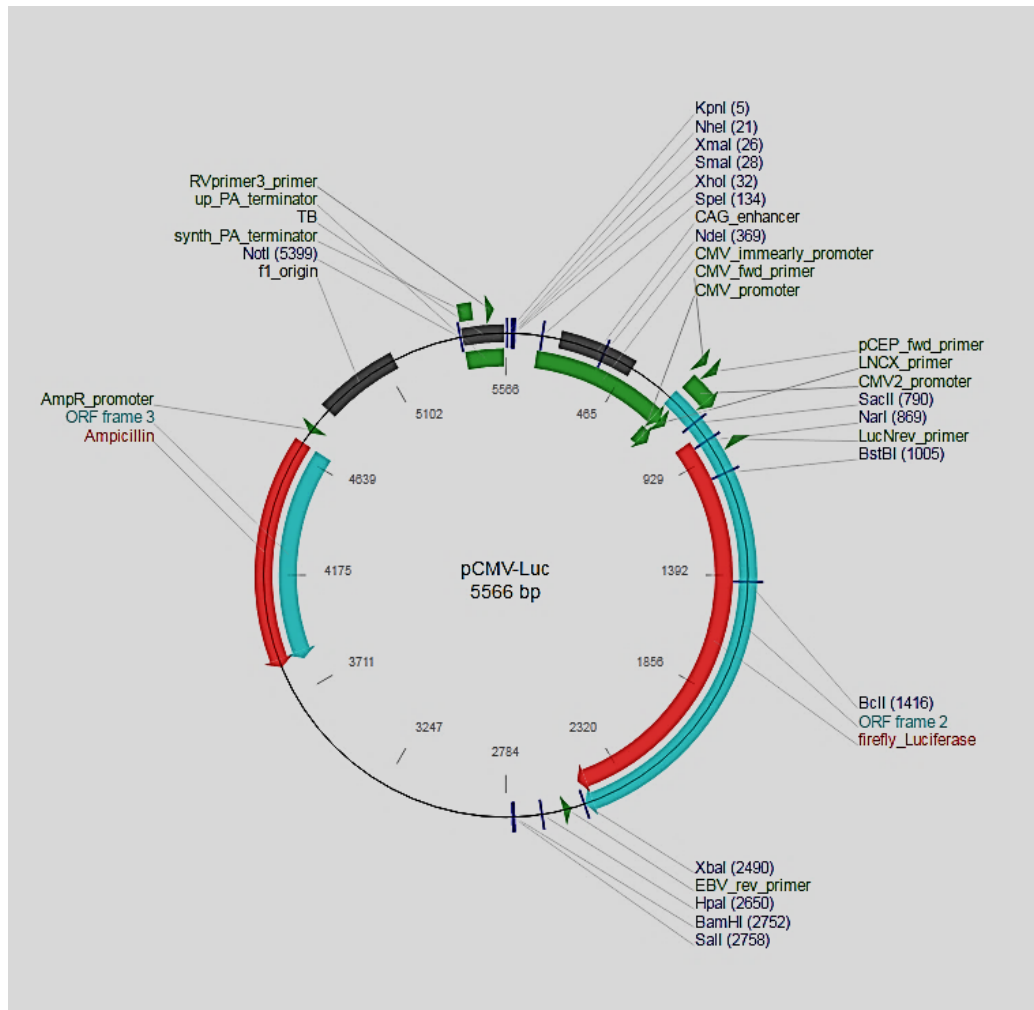


Abbildung 1.13 Plasmidkarte von pCMV-luc [67].

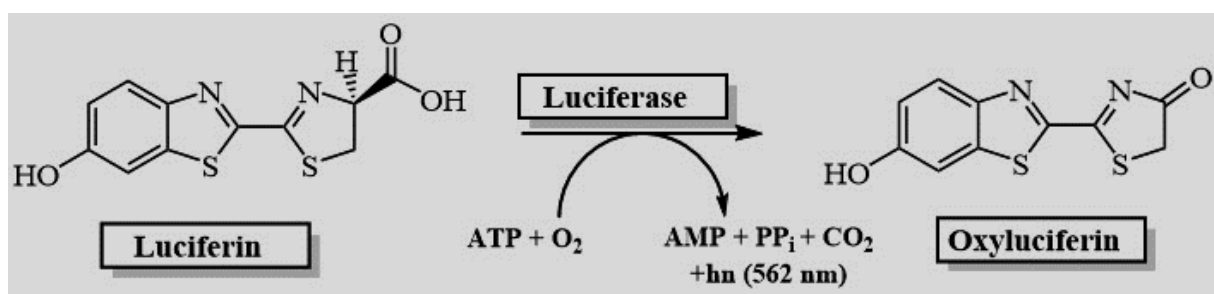


Abbildung 1.14 Darstellung des Reaktionsablaufs von Luciferin zu Oxyluciferin.

Um die Transfektionseffizienz zu quantifizieren, wird eine Enzym-Substrat-Reaktion angewendet. Hierbei reagiert das Luciferaseprotein (codiert auf dem Plasmid pCMV-luc) mit dem Substrat D-Luciferin. Durch die Anwesenheit von ATP und O₂ wird Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert. Durch die Messung der emittierten Lichtquanten (Lumineszenz), die neben AMP und CO₂ entstehen, kann die Aktivität der Luciferase bestimmt werden.

1.2 Membranlipide aus Archaeen

Archaeen repräsentieren neben den Eukaryoten und Bakterien eine Domäne des Lebens [68-70]. Sie gelten als ursprüngliche Erdbewohner, die aufgrund ihrer morphologischen und metabolischen Eigenschaften bei Temperaturen am Siedepunkt und bei stark sauren pH-Werten existieren können. Deshalb werden Archaeen auch extremophil genannt. Zudem gibt es auch halophile Archaeen, deren Habitate sich durch eine hohe Salzkonzentration auszeichnen [71], sowie barophile Archaeen [72], die unter besonders hohen Drücken überleben können. Heutige Hauptfundorte von Archaeen sind vor allem vulkanische Gebiete wie z.B. Geysire oder Black Smoker [73, 74].

Archaeen sind autotroph, d.h. sie gewinnen ihren Kohlenstoff durch Assimilation von Kohlendioxid aus der Umwelt. Zudem sind sie anaerob. Auch im menschlichen Organismus kommen Archaeen vor, vor allem der Gattung *Methanobrevibacter* [75, 76].

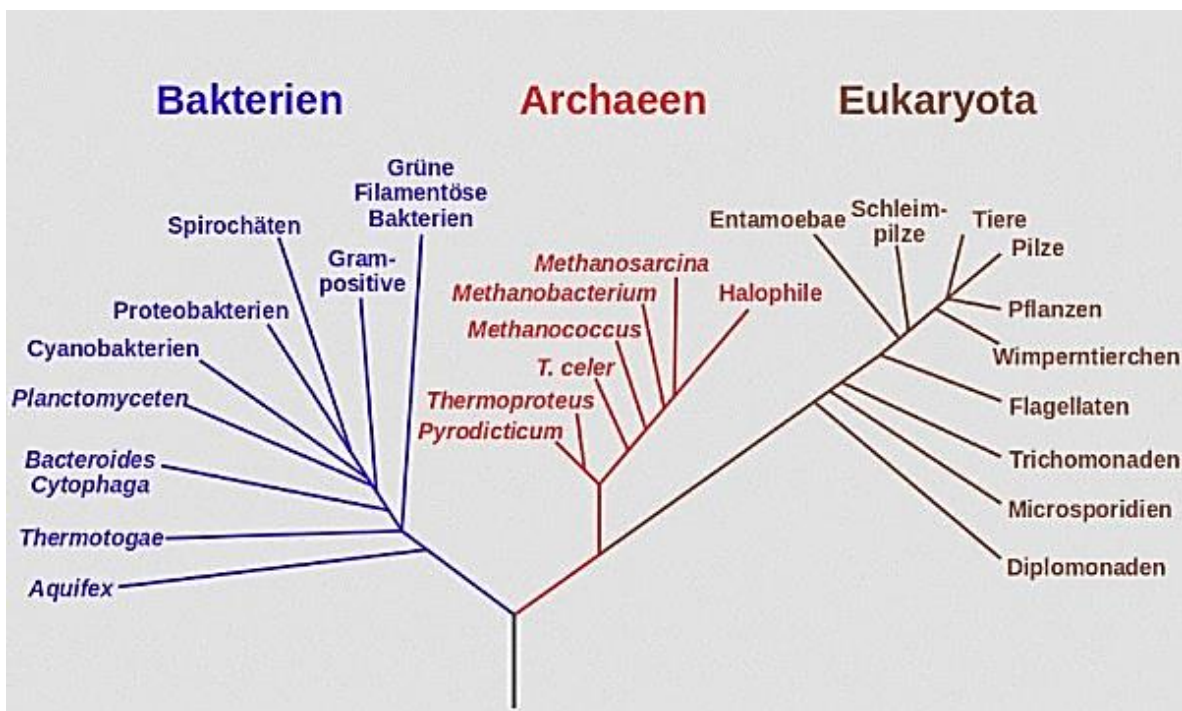


Abbildung 1.15 Darstellung der drei Domänen des Lebens [77].

Organismen lassen sich in drei Domänen unterteilen: Eukaryoten, Archaeen und Bakterien. Bei Archaeen und Bakterien handelt es sich um Prokaryoten, die keinen Zellkern besitzen. Eukaryoten umfassen alle übrigen Lebewesen. Alle drei Domänen hatten einen Vorfahren der vor ca. drei Milliarden Jahren lebte.

1.2.1 *Sulfolobus acidocaldarius*

Die Gattung *Sulfolobus* wurde erstmalig im Jahre 1966 von J.A.Brierley isoliert [78]. Es handelt sich hierbei um Archaeen, die morphologisch unregelmäßig rund erscheinen. Der Durchmesser beträgt durchschnittlich 0,8 - 1 μm . Zudem sind sie fakulativ autotroph [79] und haben sowohl eine hohe Temperatur- und Säurestabilität. Ihr Wachstumsoptimum liegt bei ca. +80 C° und einem pH-Wert von 2. Gefunden und isoliert wurde die Gattung *Sulfolobus* vorwiegend im Yellowstone National Park [80], Dominikanische Republik und Italien.

1.2.2 *Thermoplasma acidophilum*

Thermoplasma acidophilum ist heterotroph und ist eines der stärksten säureliebenden Organismen. Das Wachstumsoptimum beträgt ca. +60 °C und der optimale pH-Wert für das Wachstumsoptimum beträgt 0,5 bis 4. Genau wie Archaeen der Gattung *Sulfolobus*, besitzen sie nur eine Plasmamembran, die einen zellulären pH-Wert von 4 aufrechterhält. Nährstoffe werden durch die säure und temperaturbedingte Dekomposition von Organismen aufgenommen [81, 82].

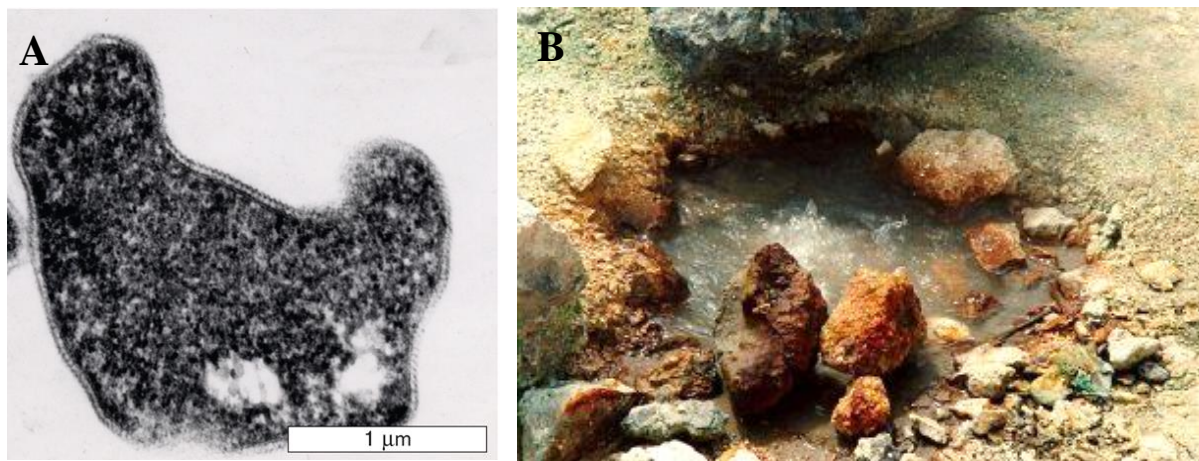


Abbildung 1.16 Darstellung der Form (A) und Lebensorte (B) von Archaeen [83, 84].

Archaeen sind in ihrer Morphologie äußerst divers. Die meisten Archaeen zählen zu den Extremophilen, d.h. sie sind an extreme Umweltbedingungen angepasst (hohe Temperaturen und niedriger pH-Wert). Man findet sie häufig in vulkanischen Gebieten (z.B. Geysire, Yellowstone-Nationalpark) oder in der Tiefsee (Black Smoker).

1.3 Tetraetherlipide

Tetraetherlipide sind die Grundbausteine der Zellmembranen von Archaeen der Gattung *Sulfolobus acidocaldarius* und *Thermoplasma acidophilum*. Die besondere Struktur der Tetraetherlipide schirmt das Zellinnere vor äußeren Einflüssen ab und sorgt für eine erhöhte Rigidität der Zellmembran.

Innerhalb der Zelle läuft die Biosynthese über den Mevalonat-Weg ab. Zusätzliche Modifikationen z.B. Kopplung mit Zuckergruppen werden durch lösliche und membranständige Enzyme herbeigeführt (Abbildung 1.17).

Grundsätzlich haben Tetraetherlipide zwei lange Kohlenwasserstoffketten (Dibiphytanylketten), die beidseitig mit einer Glycerolgruppe über eine Ethergruppe enden (Fettalkoholglycerolether) [85, 86]. Das gesamte C-40 Kohlenstoff Grundgerüst hat die einzigartige Fähigkeit die komplette Zellmembran zu durchspannen anstatt sich wie bei konventionellen Lipiden als Doppelmembran anzuordnen. Eine weitere Fähigkeit von Tetraetherlipiden ist die Ausbildung eines Wasserstoffnetzwerks zwischen den Kopfgruppen, was zu einer stärkeren Rigidität und somit erhöhen Temperaturstabilität führt. Zudem kommt es je nach Dauer der Wachstumstemperaturen der Archaeen zur Ausbildung von einzelnen Zyklopentanringen, die ebenfalls zu einer erhöhten Stabilisierung der Tetraetherlipide innerhalb der Membran führt (Abbildung 1.18) [87].

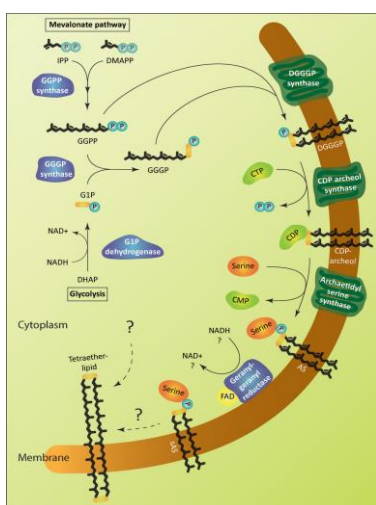
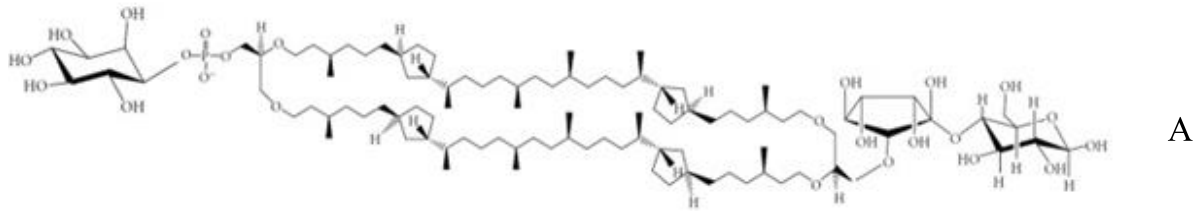
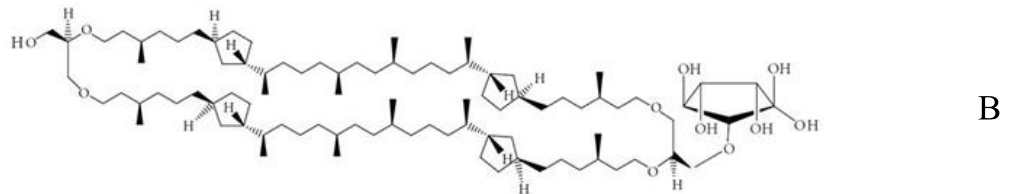


Abbildung 1.17 Biosyntheseweg von Tetraetherlipiden, Jain *et al.* [88]

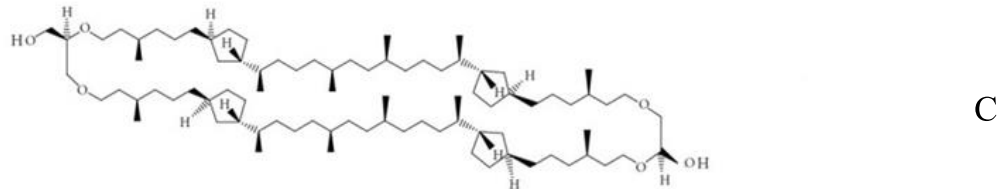
Archaeidylserin (AS) und gesättigtes AS (sAS). Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) sind Isomere. GGPP, Geranylgeranyldiphosphat; G1P, sn-glycerin-1-phosphat; GGGP, 3-O-Geranylgeranyl-sn-glyceryl-1-phosphat; DGGGP, 2,3-bis-O-Geranylgeranyl-sn-glyceryl-1-phosphat.



PLFE (polare Lipidfraktion E)



hGDNT (hydrolysiertes Glycerol-Dialkyl-Nonitol-Tetraether)



hGDGT (hydrolysiertes Glycerol-Dialkyl-Glycerol-Tetraether)

Abbildung 1.18 Strukturformeln von (A) PLFE, (B) hGDNT und (C) hGDGT.

Charakteristisch für alle drei Tetraetherlipide ist das Kohlenstoff-Rückgrat, das aus zwei langen Kohlenwasserstoffketten (Dibiphytanylketten), die beidseitig mit einer Glycerolgruppe über eine Ethergruppe enden, besteht. Ebenso besitzen alle drei Lipide Zyklopentanringe, die in ihrer Anzahl variieren können. Die hydrolysierten Tetraetherlipide hGDNT und hGDGT besitzen im Gegensatz zu PLFE keine endständigen Zuckergruppen. Alle drei Tetraetherlipide können begrenzt mit konventionellen Lipiden gemischt werden und nehmen im Liposom eine membrandurchspannende Ordnung an.

1.3.1 Native Tetraetherlipide

Die in der vorliegenden Arbeit isolierten und aufgereinigten Tetraetherlipide beschränkten sich vorwiegend auf drei Tetraetherlipidfraktionen aus *Sulfolobus acidocaldarius* und *Thermoplasma acidophilum*: Die, mit Hilfe von Salzsäure hydrolysierten, Lipide (hGDNT und hGDGT) sowie die nicht hydrolysierte polare Lipidfraktion E (PLFE). Im Falle von hGDNT befindet sich trotz Säurehydrolyse an der Glycerolgruppe eine ringförmige Nonitolgruppe (Calditolgruppe), wohingegen auf der anderen Seite die Glycerolgruppe mit einer Hydroxylgruppe abschließt. Bei hGDGT entfällt die einseitige Nonitolgruppe. Dieses Lipid besitzt an beiden Enden jeweils eine Hydroxylgruppe (Abbildung 1.18) [89].

PLFE setzt sich zu ca. 90 % aus der hGDNT und zu ca. 10 % aus der hGDGT Grundstruktur zusammen. Da diese Lipidfraktion jedoch keiner Säurebehandlung ausgesetzt wurde, enthält PLFE zusätzlich noch Phosphat- und Zuckergruppen an beiden Seiten des Moleküls. Der hGDNT Anteil hat somit die Zuckergruppe Phosphatidyl-myo-inositol an einem Ende und eine β -Glukose Gruppe an dem anderen Ende. hGDGT in dieser Fraktion enthält an den Endseiten jeweils die Zucker Phosphatidyl-myo-inositol und β -D-Galactosyl-D-glucose [90].

1.3.2 Halbsynthetische Tetraetherlipide

Halbsynthetische Tetraetherlipide stellen extrahierte und aufgereinigte Lipidfraktionen der Archaeen dar. Jedoch werden sie im Labor mit geeigneten Reagenzien weiterbehandelt. Ziel ist es hierbei, Tetraetherlipide mit zusätzlichen Endgruppen zu modifizieren.

Aufgrund der relativ hohen Verfügbarkeit von freien reaktiven OH-Gruppen, vor allem bei hGDGT, können sie durch eine Oxidationsreaktion in Carbonsäuren-Gruppen überführt werden. Als Oxidationsmittel kann hierbei das Reagenz TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperin-N-oxyl) [91] eingesetzt werden. Nach Oxidation und Aufreinigung des Produktes, lässt man die Carbonsäure-Gruppen, unter Einsatz von bestimmten Kopplungsreagenzien, mit einem Amin reagieren. Nach Abspaltung von H_2O kommt es zur Ausbildung einer einfachen Peptidbindung mit neuen Eigenschaften [92].

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, einen nicht-viralen Genvektor für die orale und pulmonale Gentherapie zu entwickeln. Die Entwicklung eines oralen bzw. pulmonalen Gentherapeutikums stellt eine große Herausforderung dar. Jedoch könnte eine solche Therapieform enorme Vorteile für den Patienten bringen (z.B. hohe Compliance) als auch für den Unternehmer (z.B. geringe Herstellungskosten).

Das größte Hindernis dieses Therapieansatzes ist die Passage durch den Magen-Darm-Trakt bzw. die Stabilität in Surfactant (grenzflächenaktive Substanz in der Lunge). Aufgrund des niedrigen pH-Wertes, werden sensitive Substanzen wie Nukleinsäuren im Magen rasch hydrolysiert. Für eine erfolgreiche Passage durch den Magen-Darm-Trakt ist somit ein geeigneter Genvektor notwendig. Dieser sollte nicht nur die Nukleinsäure schützen, sondern muss selbst auch bei niedrigem pH-Wert eine ausreichende Stabilität besitzen.

Für die Herstellung eines solchen Vektors sollten sich vor allem Tetraetherlipide aus Archaeen eignen. Diese Lipide besitzen aufgrund ihrer besonderen chemischen Struktur säurestabile Eigenschaften und sind somit prädestiniert für die Herstellung eines stabilen Genvektors für die orale Gentherapie. Weiterhin sollte dieser Genvektor eine geringe Toxizität und hohe Transfektionseffizienz aufweisen.

Um die Zielsetzung der Dissertation zu erreichen waren es folgende Schritte notwendig:

1.) Isolation der Tetraetherlipide

Hierzu wurden verschiedene Fraktionen von Tetraetherlipiden aus gefriergetrockneten Biomassen von *Sulfolobus acidocaldarius* und *Thermoplasma acidophilum*, gewonnen. Die Extraktionsverfahren beschränkten sich auf gängige Labortechniken wie Soxhlet-Extraktion (kontinuierliche Extraktion von Inhaltsstoffen aus Feststoffen) und saure/hydrolytische Extraktion. Ziel war hierbei, möglichst hohe Ausbeuten an Lipiden zu erhalten. Die anschließende Aufreinigung der Lipide erfolgte durch „Flash-Chromatographie“ an einer normalen oder C-18 modifizierter Kieselgelsäule. Die nachfolgende Charakterisierung der verschiedenen Tetraetherlipide fand mit allgemeinen Analysetechniken wie DC, ESI-MS, IR- und NMR-Spektroskopie statt.

2.) Stabile Liposomen mit Tetraetherlipiden

Die so erhaltenen aufgereinigten Fraktionen verschiedener Tetraetherlipide wurden auf ihre Fähigkeit zur Liposomenbildung (Herstellung durch die Filmmethode) untersucht. Hierbei wurden zusätzlich konventionelle Lipide wie z.B. DPPC oder DOTAP beigemischt. Eine Bewertung der hergestellten Liposomen erfolgte durch ein einfaches Scoring System (--- bis +++).

3.) Charakterisierung der Liposomen und Fähigkeit zur Komplexbildung mit pDNA

Bewertungskriterien waren hierbei Durchmesser, Lagerstabilität, PDI, Zetapotential und Verhalten bei Inkubation mit Medien verschiedener pH-Werte.

Mikroskopische Verfahren wie Rasterkraftmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie dienten zur morphologischen Charakterisierung der Lipidvesikel.

Nachfolgend sollten ausgewählte Formulierungen mit dem Plasmid pCMV-luc komplexiert werden. Das Ausmaß der Komplexbildung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzassays (GelRed™-Assay) verfolgt.

4.) Herstellung von Lipopolyplexen

Im letzten Schritt sollten sogenannte Lipopolyplexe hergestellt werden, also Komposite aus Liposomen, Polymeren und Plasmid. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Polymer beschränkte sich auf verzweigtes Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 25 kDa. Diese Komposite wurden ebenfalls bezüglich ihrer physikochemischen und morphologischen Eigenschaften untersucht.

Die Testung von ausgewählten Formulierungen hinsichtlich ihrer Zelltoxizität und Transfektionseffizienz fand an Ovarialkarzinomzellen (SK-OV-3) statt. Als Referenzsubstanzen dienten hierbei kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien wie 25kDa-bPEI und DOTAP.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software

In den nachfolgenden Tabellen sind sämtliche Geräte, Chemikalien und Software sowie deren Bezugsquellen aufgelistet.

Tab. 2 Geräte.

Bezeichnung	Bezugsquelle
ALPHA FT-IR Spektrometer	Bruker, Massachusetts, USA
Analysenwaage, Sartorius Secure®	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank HeraCELL	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axioskop	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Elektrophorese- Netzgerät MP-300V	Major Science, Saratoga, Kalifornien, USA
Eppendorf Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 10-200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 1-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gefriertrockner Alpha 1-4 LSC	Martin Christ, Osterode am Harz, Deutschland
Glasrundkolben 5 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glasrundkolben 500 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Inkubationsschüttler, IKA KS 4000	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
JPK Nanowizard 3	Jpk, Berlin, Deutschland
Kontaktthermometer	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop JSM 7500F	JEOL, Akishima, Japan
Kühlschlange	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer, IKA®RH basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Malvern Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, Worcester, England
Massenspektrometer Q-Trap 2000	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Multikanal Pipette Pipet-Lite Multi Pipette L8-300XLS+	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland

NMR-Spektroskop ECX-400	JEOL, Akishima, Japan
Rotationsverdampfer Heidolph Laboroto 4001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Soxhlet Aufsatz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

Tab. 3 Zubehör.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Gelelektrophoresezubehör	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Mini-Extruder	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Mörser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pistill	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rührfisch	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 4 Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Einmalpipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Extraktionshülsen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HPTLC-Platten	Merck, Darmstadt, Deutschland
Micro Tube 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger, 76 mm x 26 mm	Knittel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polycarbonatmembranen 0,2 µm, 0,1 µm	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Silikonwafer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sterilfilter Aufsatz 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tab. 5 Chemikalien und Ausgangsstoffe.

Bezeichnung	Bezugsquelle
1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan	Lipoid, Ludwigshafen, Deutschland
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	Lipoid, Ludwigshafen, Deutschland
1-[3-(Dimethylamino)-propyl]-piperazin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Biomassen von <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> und <i>Thermoplasma acidophilum</i>	Surface & Interface Technologies, Rosenhof GmbH“, Heiligenstadt, Deutschland
Caldarchaeol-Dicarbonsäure	IPTB Uni Marburg
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cholesterol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deuteriertes Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dichlormethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
GelRed™	Biotium Inc, Kalifornien, USA
Heparin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kieselgel	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MTT-Reagenz(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
PEI, 25 kDa verzweigt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Plasmid (pCMV-luc)	Plasmid Factory, Bielefeld, Deutschland
Salzsäure 37 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Silikonöl	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-n-oxy)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA

Tab. 6 Selbst hergestellte Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
DNA-Ladepuffer	Glycerol	3,9 ml
	SDS (10 % w/v)	500 µl
	EDTA (0,5 M)	200 µl
	Bromphenolblau	0,025 g
	Xylencyanol	0,025 g
	Milli-Q-Wasser	10 ml
Physiologischer Puffer	HEPES	2,38 g (=10 mM)
	Natriumchlorid	8,75 g (=150 mM)
	Milli-Q-Wasser	1000 ml
	pH 7,4	
TAE-Puffer (10x)	Tris-HCl	48,4 g (=400 mM)
	Essigsäure	11,42 ml (=20 mM)
	EDTA (0,5 M), pH 8,0	40,00 ml (=20 mM)
	Milli-Q-Wasser	1000 ml
Triton X-100 (0,1 % v/v)	Triton X-100	100 µl
	Milli-Q-Wasser	ad 10 ml
MTT-Reagenz (0,2 mg/ml)	MTT-Reagenz	0,2 g
	Milli-Q-Wasser	100 ml
KCl/HCl-Puffer	Kaliumchlorid (0,1 M)	50 ml
	Salzsäure (0,1 M)	10,6 ml
	pH 2,0	

Essigsäure/Acetat-Puffer	Essigsäure (0,1 M)	41,0 ml
	Natriumacetat	9,0 ml
	pH 4,0	
TRIS-HCl-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan (0,1 M)	50 ml
	Salzsäure (0,1 M)	41,4 ml
	pH 7,4	
Glycin-NaOH-Puffer	Glycin (0,1M)	50 ml
	Natriumhydroxid (0,1 M)	8,8 ml
	pH 9,0	

Tab. 7 Verwendete Kits und gebrauchsfertige Lösungen.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Cytotoxicity Detection Kit	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Fetales Kälberserum, FKS Gibco	ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
IMDM, Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin -EDTA für Zellkultur	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tab. 8 Genutzte Software.

Bezeichnung	Bezugsquelle
MS-Office 2016	Microsoft
ChemDraw Professional 15	Perkin Elmar, Waltham, USA
JPK Data Processing	JPK, Berlin, Deutschland
Origin Pro 9.0	Originlab, Massachusett, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion und Aufreinigung der Tetraetherlipide

Das Ausgangsmaterial sämtlicher Extraktions- und Aufreinigungsprozesse der Tetraetherlipide waren die gefriergetrockneten Biomassen von *Sulfolobus acidocaldarius* und *Thermoplasma acidophilum*. Bezogen wurden sie von der Firma „Surface & Interface Technologies, Rosenhof GmbH“ in Heiligenstadt, Deutschland.



Abbildung 3.1 Biomassen von *Sulfolobus acidocaldarius* (A) und *Thermoplasma acidophilum* (B). Die groben bzw. sandigen Ausgangsmassen der Archaeen werden üblicherweise gefriergetrocknet verkauft und haben eine schwarze oder bräunlich/gelbliche Erscheinungsform.

3.2.2 Extraktion der Rohlipide (TEL)

6,5 g der Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* wurde zu einem feinen Pulver gemörsert und anschließend in eine Extraktionshülse aus Zellulose überführt. Die Extraktion erfolgte mithilfe einer Soxhlet-Apparatur (Abbildung 3.2). Hierbei handelt es sich um eine kontinuierliche Extraktion aus Feststoffen, bei der ständig frisches Lösungsmittel durch Verdampfen und Kondensation erzeugt wird. Als Extraktionsmittel diente ein auf +80 °C erhitztes und frisch zubereitetes Lösungsmittelgemisch $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (50/50 v/v). Die Gesamtdauer der Extraktion betrug 72 h. Nach Beendigung der Extraktion konnte die Rohlipidmasse durch Abdestillation des Lösungsmittels mithilfe eines Rotationsverdampfers gewonnen und ausgewogen werden. Die Ausbeute von TEL betrug 541 mg.

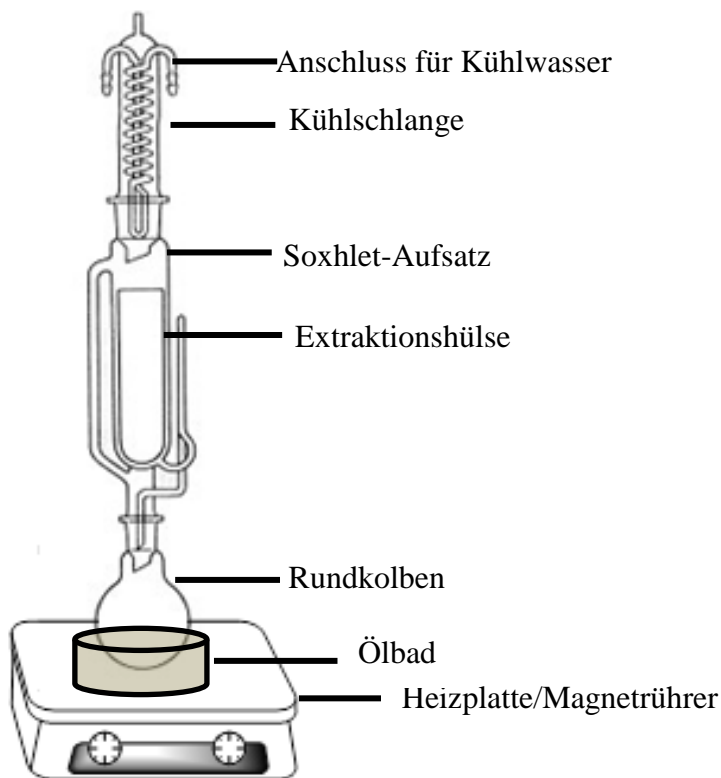


Abbildung 3.2 Aufbau einer Soxhlet-Apparatur [93].

Bei einer Soxhlet-Apparatur wird der Rundkolben mit einem Extraktionsmittel gefüllt. Aufgrund der Erwärmung des Kolbens mit Hilfe einer Heizplatte und Ölbad, verdampft das Lösungsmittel und kondensiert an der obigen Kühlschlange. Das Kondensat tropft von oben in die Extraktionshülse, in dem sich der Feststoff befindet. Sobald ein bestimmtes Volumen innerhalb des Soxhlet-Aufsatzes erreicht wird, fließt das Lösungsmittel mitsamt gelösten Lipiden wieder zurück in den Rundkolben. Dieser Vorgang wiederholt sich ständig und sorgt für eine erschöpfende Extraktion der Lipide aus dem Feststoff.

3.2.3 Extraktion und Aufreinigung der polaren Lipidfraktion (PLFE)

6,0 g der gefriergetrockneten Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* wurde fein gemörsert bis ein grün/braunes Pulver entstand. Dies wurde in eine Extraktionshülse überführt, welche in eine Soxhlet-Apparatur eingesetzt wurde. Das Extraktionsmittel war eine Mischung aus $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (50/50 v/v) und befand sich in einem 500 ml-Rundkolben. Die Extraktion dauerte 48 h bei einer eingestellten Temperatur von $+80\text{ }^\circ\text{C}$. Anschließend ließ man das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abdestillieren und erhielt einen Lipidfilm im Rundkolben.

Die Aufreinigung der Lipidmasse erfolgte an einer selbstgepackten Säule (Chromabond C-18). Nach Auftragung der Lipidmasse, und der darauffolgenden Aufbringung von Seesand eluierte man mit folgenden Lösungsmitteln: $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50 v/v), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

(22,5/55/22,5 v/v/v) und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (70/26/4 v/v/v). Alle Fraktionen wurden per Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Ausbeute betrug 190 mg.

3.2.4 Extraktion und Aufreinigung von hydrolysierten Tetraetherlipiden (*hGDNT* und *hGDGT*)

10,0 g der gefriergetrockneten Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* bzw. *Thermoplasma acidophilum* wurde 15 min in einem Mörser solange verrieben bis ein grün/braunes Pulver entstand. Anschließend versetzte man das fein gemörserte Pulver mit 200 ml einer 4 M HCl Lösung. Die Erhitzung des 500 ml-Rundkolbens auf +100 °C in einem Ölbad über 24 h erfolgte unter Benutzung eines Rückflusskühlers.

Nach Abkühlung des Rundkolbens auf RT wurde die Suspension durch eine G4-Fritte filtriert, um wasserlösliche Zellorganellen von wasserunlöslichen Lipiden zu trennen. Nach mehrmaligem Ausschütteln der Lipidmasse mit CHCl_3 konnten die Lipide grob gereinigt werden. Die extrahierten Lipide dienten als Ausgangsmasse zur chromatographischen Aufreinigung und Trennung an einer Kieselgelsäule. Die gläserne Säule (30 x 2 cm) wurde mit, zuvor in CHCl_3 aufgeschlämmtem amorphen Aerosil (48 g) befüllt. Das Lösen der Lipidmasse erfolgte in 1 ml CHCl_3 . Das Hinzufügen von Seesand diente als Schutz vor starken Verwirbelungen bei der Lösungsmittelzugabe. Die gesamte chromatographische Aufreinigung war eine sogenannte „Flash-Chromatographie“, d.h. die Fraktionierung der Lipide erfolgte mit Überdruck. Für die erste Elution an der Säule benutzte man 300 ml CHCl_3 , gefolgt von 300 ml einer Mischung aus CHCl_3/DE (80/20 v/v) und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10 v/v). Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und unmittelbar nach Erhalt mit Hilfe von HPTLC analysiert. Die abschließende Reinigung des Lipids wurde durch eine Fällung mit warmen Aceton erreicht. Hierzu löste man das Lipid in einer geringen Menge aus CHCl_3 und gab die 5-fache Menge an Aceton (+40 °C) hinzu. Nach anschließender Zentrifugation konnte man das ausgefallene Lipid sammeln und erneut lösen. Das Lipid wurde ausgewogen und nachfolgend instrumentell analysiert.

Für *hGDNT* und *hGDGT* betrugen die Ausbeuten 195 mg bzw. 320 mg.

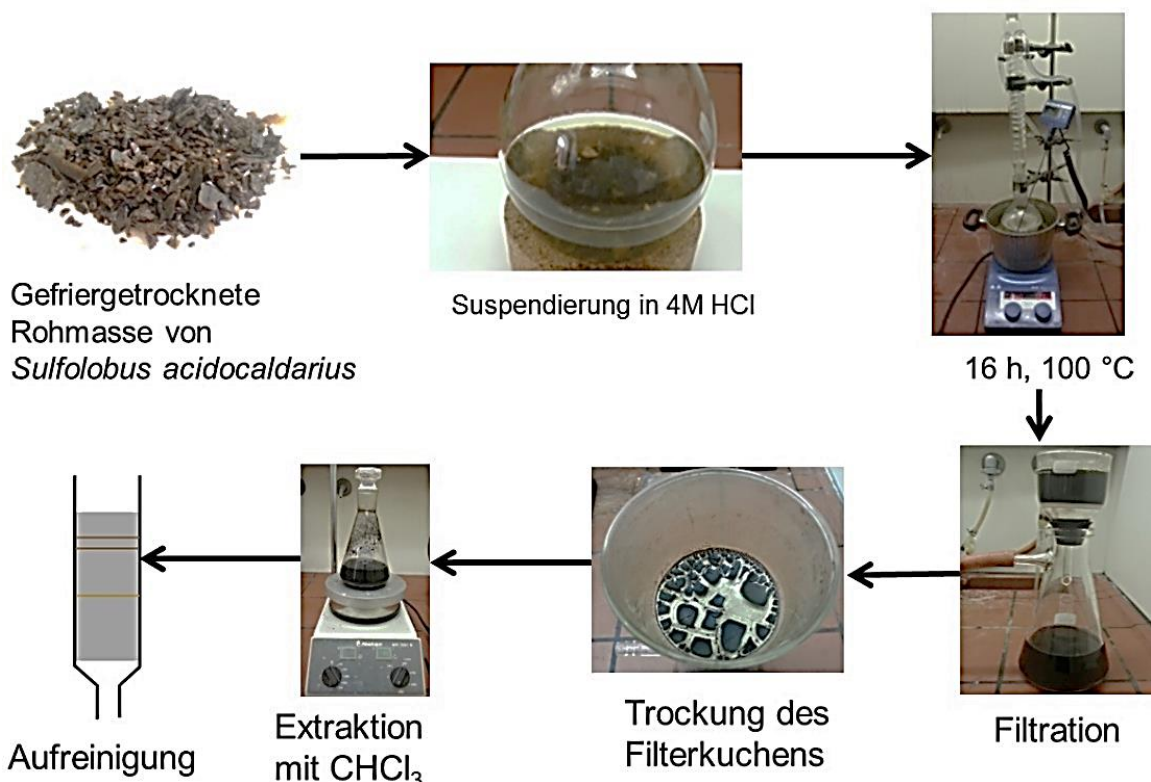


Abbildung 3.3 Schematischer Ablauf der Extraktion von hGDNT und hGDGT.

Die gefriergetrocknete Rohmasse der Archaeen wurde fein gemörsert, in 4 M HCL suspendiert und über 24 h bei +100 °C mit Hilfe eines Rückflusskühlers erhitzt. Die anschließende Unterdruckfiltration erfolgte mit einer G-4 Fritte. Der getrocknete Filterkuchen durchlief eine mehrmalige Extraktion mit CHCl₃ bevor das Extrakt mit einer Kieselgelsäule aufgereinigt wurde.

3.3 Synthese von halbsynthetischen Tetraetherlipiden

36 mg (27,1 µmol) Caldarchaeoldicarbonsäure, 27,85 mg (162 µmol, 6 Äquivalente) 1-[3-(Dimethylaminopropyl)]-piperazin wurden bei Raumtemperatur in 1 ml DMF vorgelegt, 71,83 mg (162 µmol, 6 Äquivalente) BOP-Reagenz portionsweise hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt (Abbildung 3.4). Eine Reaktionskontrolle mittels DC, direkt aus dem Reaktionsansatz, konnte nicht durchgeführt werden, da das im Überschuss eingesetzte 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-piperazin zu einer verschmierten Spur auf der DC-Platte führte und deshalb andere Spots nicht eindeutig erkennbar waren.

Das DMF wurde unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und 6-mal mit 20 ml Wasser extrahiert. Dadurch wurde das überschüssige 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-piperazin entfernt, das in die wässrige Phase ging. Die organische Phase wurde eingengt und mittels DC analysiert. Anschließend wurde das Produkt mittels Kieselgel (Kieselgel 60, Macherey-Nagel) mit dem Elutionsmittel

DCM/MeOH/AcOH (80/20/0,5 v/v/v) gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Die Ausbeute betrug 30 mg.

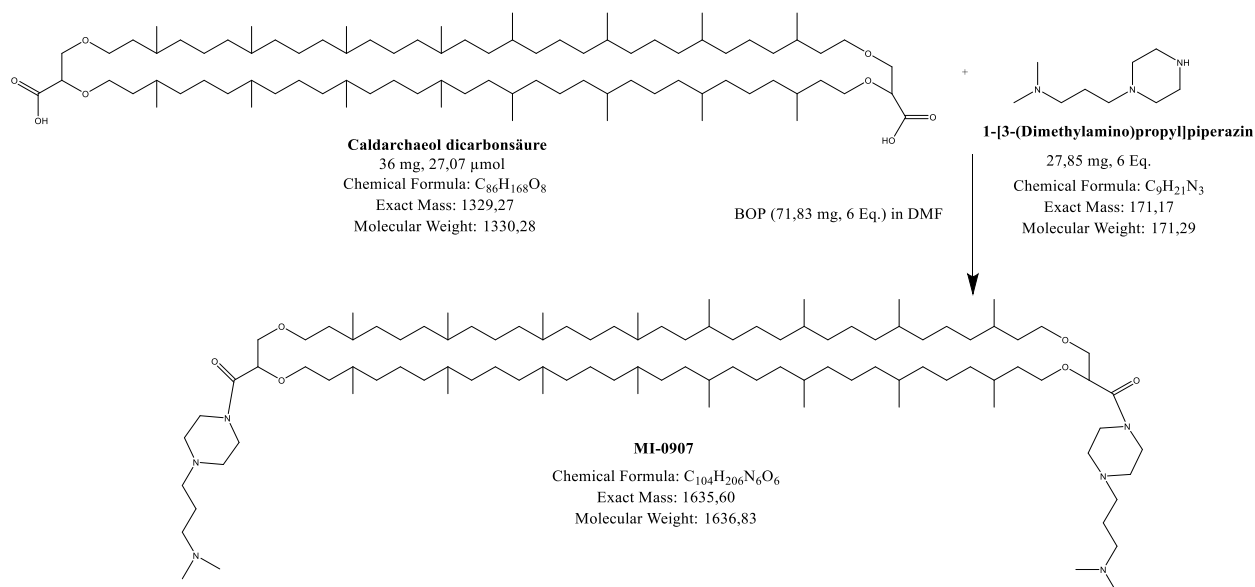


Abbildung 3.4 Syntheseweg von MI-0907.

3.4 Herstellung der Liposomen, Lipoplexe und Lipopolyplexe

Die Herstellung der Liposomen erfolgte nach der Filmmethode (Abbildung 3.5) [94]. Für jedes Lipid wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 6 mg/ml hergestellt. Falls Liposomen aus zwei oder mehreren Lipiden bestehen sollten, gab man das molare Verhältnis (mol/mol) an. Hierzu errechnete man über das jeweilige Molekulargewicht die erforderlichen Volumina an Lipidlösungen. Die Volumina der Lipide pipettierte man in einen 5 ml-Rundkolben, und ergänzte, falls notwendig mit 1 ml organischem LM ($CHCl_3$ /MeOH (2/1 v/v)). Zum Abdestillieren des Lösungsmittelgemisches und damit sich ein homogener, transparenter Lipidfilm am Rundkolbenboden bilden konnte, befestigte man das Gefäß mit einer Kombiklammer an einem Rotationsverdampfer. Der Rundkolben wurde danach abgesenkt bis er mit dem Lösungsmittel-Lipid-Gemisch vollständig in ein +60 °C warmes Wasserbad eintauchte. Durch die Spirale des Verdampferkühlers wurde eisgekühltes Wasser geleitet. Dadurch schlug sich das verdampfende Lösungsmittelgemisch an der Spirale nieder und tropfte in einen Auffangbehälter. Der Rundkolben rotierte durchgehend im Wasserbad mit 285 rpm während eine Vakuumpumpe abhängig von der Zeit einen entsprechenden Unterdruck erzeugte (Tab 9).

Tab. 9 Einstellung der Vakuumpumpe während der Abdestillation des Lösungsmittels.

Innerhalb von 30 s verringert sich der atmosphärische Druck (ca. 1bar) auf 800 mbar gefolgt von einer weiteren Reduktion auf 300 mbar bis 5 min. Der weitere Druckabfall wurde nach einem Zeitpunkt von 10 min erreicht (2 mbar). Dieser wurde bis 1 h aufrechterhalten.

Δt	p [mbar]
00:00:00	ATM
00:00:30	800
00:05:00	300
00:10:00	2
01:00:00	2

Der vollständig getrocknete Lipidfilm wurde anschließend im +60 °C warmen Wasserbad mit HEPES Puffer (pH 7,4) hydratisiert. Durch einfaches Schütteln des Rundkolbens entstanden multilamellare Liposomen. Eine Vorzerkleinerung der großen Liposomen fand mit Hilfe eines Ultraschallbades statt (ca. 10 min). Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen kam der Lipofast Extruder von Avestin (vorgewärmt auf +60 °C). Dafür entnahm man 1 ml der Liposomenprobe und extrudierte sie 11 Mal durch Polycarbonatmembranen (Porengößen: 200 nm bzw. 100 nm) [97]. Durch die anschließende Sterilfiltration der fertigen Liposomen mithilfe eines Spritzenfilters (Porengröße: 0,2 µm) waren die Liposomen bereit für den Einsatz in Zellkulturexperimenten. Fertige Liposomen wurden vor Durchführung der Zellexperimente über Nacht im Kühlschrank bei +4 °C gelagert. Die Gesamtkonzentration der Liposomen betrug 6 mg/ml.

Zur Herstellung der Lipoplexe wurde verschiedene Mengen an Liposomen kurz vor Ausführung der Experimente mit pDNA in einem physiologischen Puffer verdünnt und miteinander komplexiert. Eine Inkubation für 20 min bei RT führte zu stabilen Lipoplexen [95].

Die Herstellung der Lipopolyplexen erfolgte durch die vorherige Herstellung von Polyplexen (N/P 6) und darauffolgender Beimischung von Liposomen in einem Masseverhältnis von 5/1 (µg Liposomen/ µg pDNA). Hier war eine Inkubation von 60 min bei RT notwendig (Abbildung 3.6) [96].

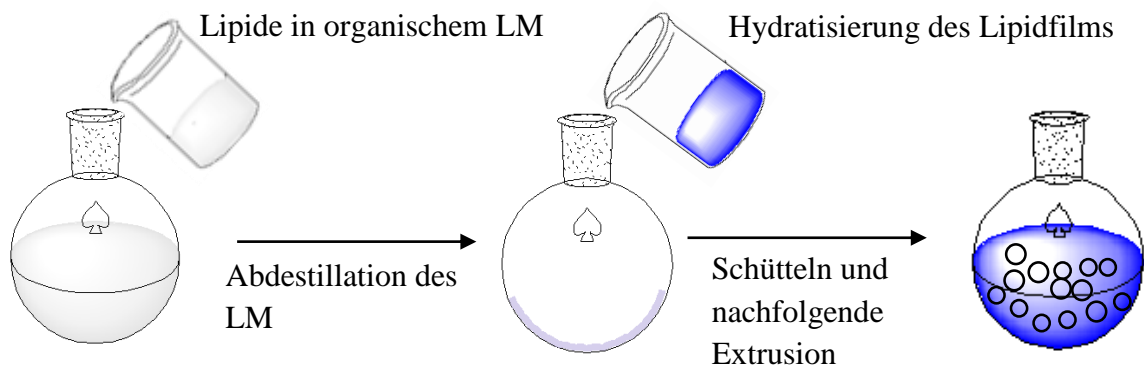


Abbildung 3.5 Herstellung von Liposomen nach der Filmmethode.

Lipide werden in einen Rundkolben überführt. Durch Abdestillation des Lösungsmittels entsteht ein Lipidfilm, der anschließend mit einer wässrigen Pufferlösung hydratisiert wird. Durch einfaches Schütteln des Rundkolbens entstehen erst multilamellare Vesikel, die durch Extrusion in unilamellare Liposomen überführt werden können.

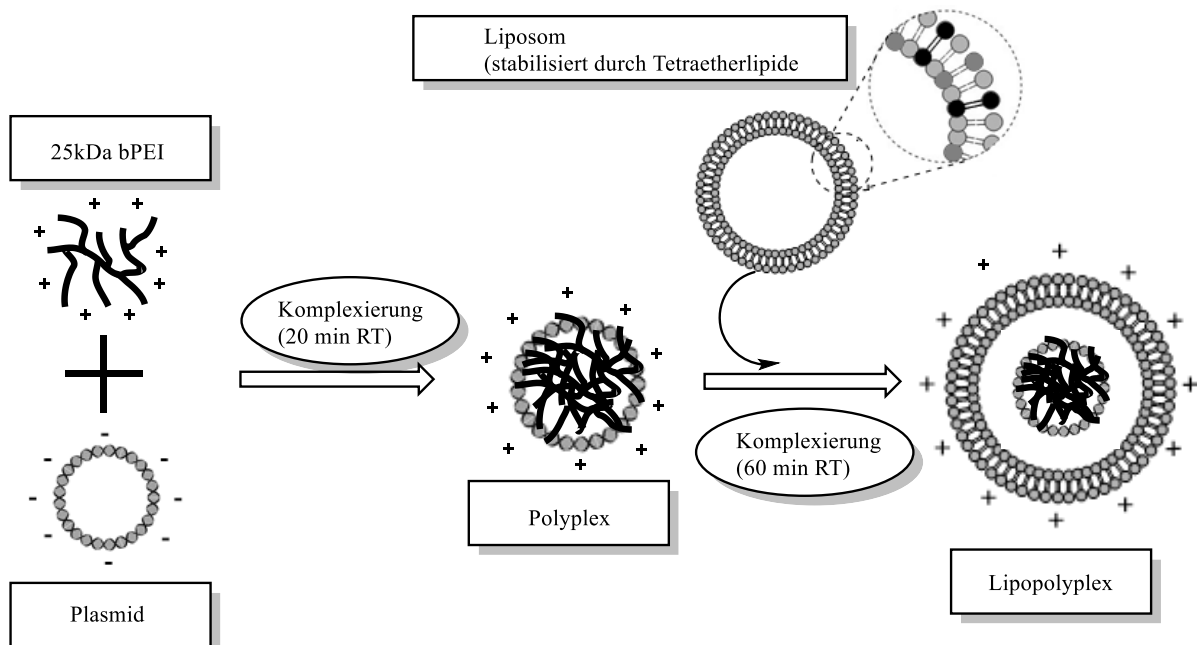


Abbildung 3.6 Verfahren zur Herstellung von Lipopolyplexen

Das Polymer 25kDa-bPEI erzeugt bei Inkubation mit pDNA einen positiv geladenen Polyplex. Bei Zugabe von einer wässrigen Liposomendispersion erfolgt die Bildung von sogenannten Lipopolyplexen.

3.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers wurde das Verfahren der dynamischen Lichtstreuung angewendet. Es ist als „Photonenkorrelationsspektroskopie“ (PCS) oder „quasielastische Lichtstreuung“ (QELS) bekannt. Hierzu wurde der Zetasizer Nano ZS (Malvern) verwendet. Als Lichtquelle kam ein HeNe-Laser (10 mW) zum Einsatz.

Stokes-Einstein-Beziehung:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{Formel 1}$$

D = Diffusionskoeffizient

k = Boltzmann-Konstante

T = Temperatur in Kelvin

η = Viskosität des Mediums

r = Partikelradius

Durch die resultierende Interferenz der Lichtstreuungen einzelner Partikel entstehen Fluktuationen in der Streulichtintensität, die zeitlich ausgewertet werden. Diese Intensität der Streuung des Laserlichts, das in einem Winkel von 173° gemessen wird, dient zur Berechnung der Größe der Partikel (Abbildung 3.7). Die Brown'sche Molekularbewegung dient als Grundlage zur Berechnung der Partikelgröße [98, 99]. Somit hat ein kleineres Teilchen im Vergleich zu großen Teilchen eine höhere Eigenbewegung, die eine schnellere Änderung der gestreuten Lichtquanten bewirkt (Stokes-Einstein Gesetz) [100].

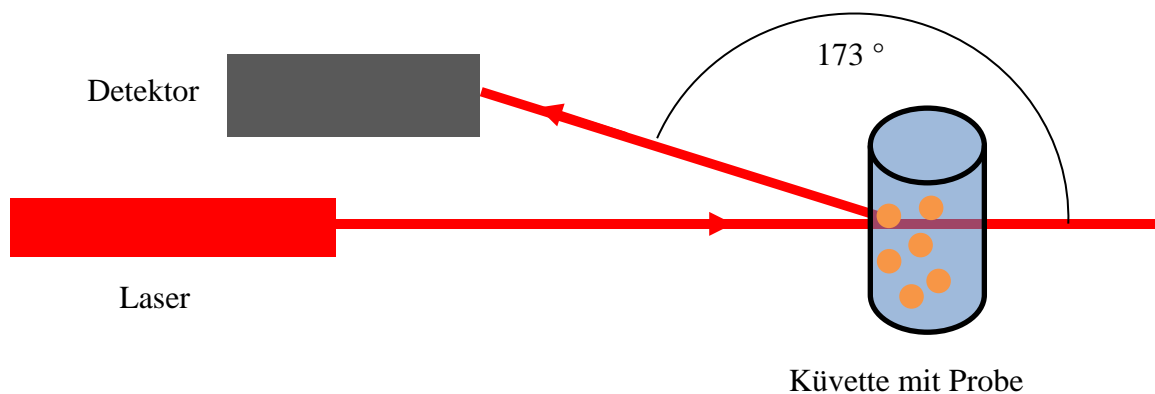


Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der dynamischen Lichtstreuung.

Der Laserstrahl trifft auf Partikel, die sich in einer Küvette befinden und wird gestreut. Durch Erfassung des Streulichts in einem Winkel von 173° durch einen Detektor und nachgeschalteten Korrelators können „Zitterbewegungen“ der einzelnen Partikel gemessen werden. Das Ausmaß dieser Partikelbewegungen steht im Zusammenhang mit den einzelnen Partikelgrößen.

Zur Messung wurden die einzelnen Proben mit Milli-Q-Wasser in einem Verhältnis 1:50 verdünnt, in eine Küvette (Typ: DTS0160) überführt und auf eine Temperatur von 23 °C gebracht. Drei unabhängige Proben wurden jeweils drei Mal mit mindestens jeweils 10 „runs“ gemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Die Position der Laserquelle zur Probe, als auch die Blende zur Regulierung der Laserintensität wurden vom Zetasizer vor jeder Messung automatisch eingestellt. Die relative Standardabweichung einer Probe wird durch die Polydispersität (PDI) angegeben. Diese kann grob in drei Kategorien unterteilen werden: als monodispers werden Proben mit einer Polydispersität von 0,2 oder weniger bezeichnet. Eine Polydispersität von 0,2 - 0,3 wird als mittlerer Wert betrachtet. Ist die Polydispersität $> 0,3$ dann ist die Probe sehr uneinheitlich.

3.6 Zetapotential

Durch das Vorhandensein von gelösten Ionen in der Dispersion kommt es zur Anlagerung von Gegenionen an die Oberfläche der Partikel. Durch die Anlagerung kommt es zur Ausbildung der Helmholtz-Doppelschicht. Durch Anlagerung weiterer lockerer gebundener Ionen entsteht eine diffuse ungeordnete Schicht. Im Endeffekt erscheint dieses Partikel Ladungsneutral, weil sich die Ladungen am Partikel und Ionenladungen innerhalb des gesamten Suspensionsmediums ausgleichen [101].

Um das Zetapotential zu bestimmen wurde ebenfalls der Zetasizer Nano ZS verwendet. Die Messung des Zetapotentials fand direkt im Anschluss an die Größenmessung der Partikel statt. Das Messprinzip zur Bestimmung des Zetapotentials ist die Laser-Doppler-Anemometrie. Dazu wird an beide Elektroden der Küvette eine Spannung angelegt, die dazu führt, dass Partikel mit ihrer Ladung zu den gegensätzlichen Elektroden wandern. Durch die Frequenzunterschiede zwischen den gestreuten Lichtern von stationären Partikeln und sich bewegenden Partikeln errechnet sich die Geschwindigkeit. Diese wiederum dient zur Berechnung der Ladung der Partikel.

Die Umrechnung der Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel in ein Zetapotential erfolgt mit der Henry-Funktion bzw. Hückel- und Smoluchowski-Näherung [102] (Formel 2).

Henry-Gleichung:

$$U_E = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot \zeta \cdot f(Ka)}{3 \cdot \eta} \quad \text{Formel 2}$$

ϵ = Dielektrizitätskonstante der Probe

ζ = Zetapotential

$f(Ka)$ = Henry Funktion

η = dynamische Viskosität

U_E = elektrophoretische Beweglichkeit

3.7 Rasterkraftmikroskopie

Zur genauen Untersuchung der allgemeinen Morphologie und Oberflächenstrukturen von Liposomen und Lipoplexen wurde das Rasterkraftmikroskop herangezogen. Die Messungen fanden an dem institutseigenen „JPK Instruments, Berlin, Nanowizzard 3“ statt. Das Mikroskop befand sich während den Messungen in einer schallisolierten Kammer. Die Temperatur während der Messung betrug +23 °C.

Bei diesem Instrument dient eine feine Nadel (auch Tip genannt), die am Ende eines Cantilevers sitzt, als Abtaster der Partikel. Der Cantilever verhält sich so wie eine Feder mit einer Kraftkonstante, einer entsprechenden Amplitude und Frequenz. Jeder kommerziell erhältliche Cantilever hat spezifische Daten, die genau auf die vorliegende Probe abgestimmt werden müssen [103]. Für harte Proben, z.B. Oberflächen benötigt man einen Cantilever mit einer hohen Kraftkonstante während bei weicheren Proben wie z.B. Liposomen, Lipoplexen oder Lipopolyplexen ein Cantilever mit einer niedrigen Kraftkonstante eingesetzt werden muss.

Zur Messung der einzelnen Proben wurde ein Cantilever (NSC 14/AlBs) mit pyramidalen Si_3N_4 Spitze verwendet. Der Cantilever hatte eine Länge von 125 μm eine Breite von 25 μm und einer Dicke von 2,1 μm . Die Kraftkonstante betrug 5 N/m und die Resonanzfrequenz lag bei 140 kHz. Aufgrund von Höhen und Tiefen auf der Probe, kommt es zu verschiedenen starken

Auslenkungen der Nadel in x, y und z Richtung, was die Amplitude des Cantilevers beeinflusst. Diese Auslenkungen werden durch einen Laserstrahl detektiert, der von der Rückseite des Cantilevers auf einen Photodetektor reflektiert wird (Abbildung 3.8). Gemessen wurde im „intermittent-contact“-Modus, wobei die Nadel des Cantilevers die Probe nur zwischenzeitlich berührt jedoch keinen dauerhaften Kontakt ausübt [104]. Dies hat den Vorteil, dass sowohl Nadel als auch Probenoberfläche geschont werden. Die Liposomen und Lipoplexe sowie Lipopolyplexe wurden vor der Messung 1:100 in Milli-Q-Wasser verdünnt und auf einen 1 x 1 cm großen Silikonwafer pipettiert. Nach 20 minütiger Inkubation wurde die Suspension abgesaugt und die zurückbleibenden Partikel analysiert. Die Bildausschnitte hatten eine Größe von 3 x 3 µm. Die Scangeschwindigkeit betrug 0,5 - 1,5 Hz. Die Größenbestimmungen der Partikel wurden mithilfe des Höhenbildes durchgeführt. Hierzu zählte man zehn Partikel und bildete einen Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung.

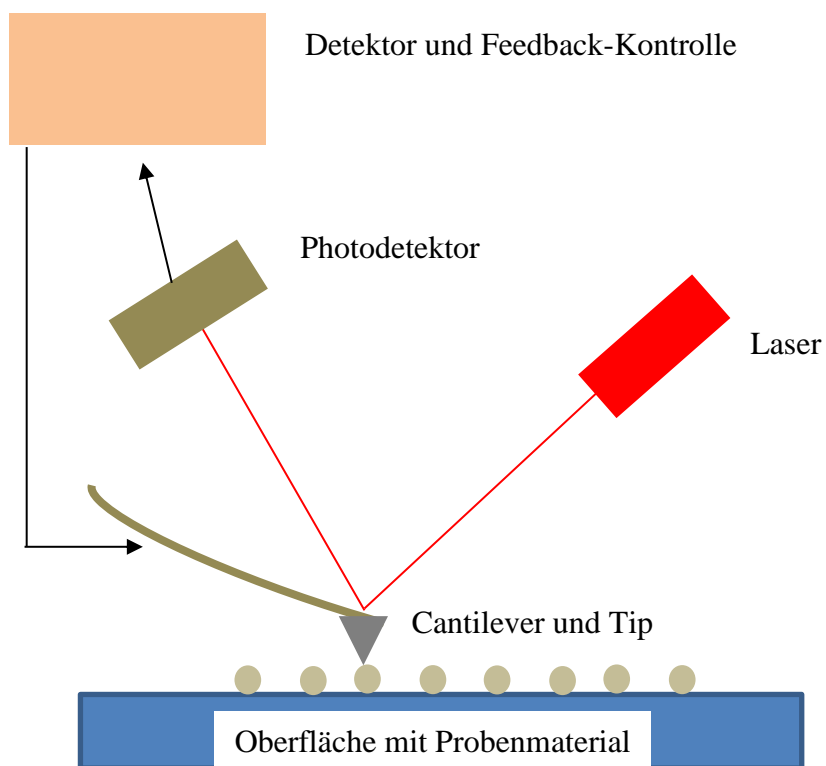


Abbildung 3.8 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops.

Eine Messspitze (engl. *tip*), die sich an der Spitze des Cantilevers befindet, wird als Messsonde (engl. *probe*) in geringem Abstand über die Probenoberfläche geführt. Ein piezoelektrischer Scanner bewegt hierfür entweder die Spitze über die Probe oder die Probe unter der feststehenden Spitze. Die Verbiegungen des Cantilevers, hervorgerufen durch Kräfte zwischen Probe und Spitze, werden hochaufgelöst gemessen, meist indem ein Laserstrahl auf die Spitze gerichtet und der reflektierte Strahl mit einem Photodetektor aufgefangen wird.

3.8 Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM)

Die Messungen mittels Kryo-REM fand im „Struktur- & Technologieforschungslabor“ (STRL) der Philipps-Universität Marburg statt. 10 µl der Probensuspension pipettierte man auf einen Probehalter, der anschließend in flüssigen Stickstoff eingetaucht wurde. Die Probe überführte man im gefrorenem Zustand in eine Vorbereitungskammer des Mikroskops „JEOL JSM-7500F“ (Abbildung 3.9). Mit Hilfe einer feinen Klinge erzeugt man eine Bruchkerbe. Anschließend erfolgte die Besputterung mit Gold, um so die Leitfähigkeit der Probe zu erhöhen. Die Temperatur betrug innerhalb der Probenkammer während der gesamten Messung -170 °C [105].



Abbildung 3.9 Aufbau eines Kryo-REM („JEOL-7500F“).

3.9 Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM)

Die Messungen der Proben mit Hilfe von Kryo-TEM fanden an der Universität Freiburg im Arbeitskreis von Prof. Rolf Schubert statt. Zur Vorbereitung der Messung wurden die Proben zunächst lyophilisiert. Anschließend versetzte man sie mit 0,5 ml Puffer und inkubierte für mindestens 30 min bei RT. Ein kleiner Tropfen (ca. 3 μ l) der Liposomenprobe wurde auf ein mit Lochfolie befilmtes und mit Kohle bedampftes 400 x 100 mesh Kupfernetz (Grid) aufgebracht. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit mit einem Filterpapier, tauchte man das Grid sofort in flüssiges Ethan (Kryogen, 90 K) ein. Nach Schockgefrierung fand die Fixierung im Kryo-Probenhalter statt. Anschließend überführte man die Präparate mit Hilfe einer Kryo-Transfervorrichtung in die Probenkammer des Mikroskops [105].

3.10 NMR-Spektroskopie

Das Grundprinzip der NMR-Spektroskopie ist die Messung der sogenannten kernmagnetischen Resonanz. Diese beruht auf der Tatsache, dass Atomkerne einen Spin (Eigendrehimpuls) aufweisen, wenn man sie einem magnetischen und oszillierenden Magnetfeld aussetzt [106].

Zur Analyse der Lipide wurden ca. 5 mg Lipid in ein Probenröhrchen gegeben und mit deuteriertem CHCl_3 verdünnt. Die Messung fand an einem „JEOL ECX-400“ mit Autotune-Probenkopf statt und erfolgte automatisiert. Eine Auswertung der Spektren fand mit Hilfe der „NMR Data Processing“-Software von JEOL statt.

3.11 IR-Spektroskopie

Das Prinzip der IR Spektroskopie ist die Absorption von Infrarotstrahlung (Wellenzahl: 400 - 4000 cm^{-1}) zur Identifizierung von funktionellen Gruppen. Durch die Absorption von Energie werden die Moleküle von einem energieärmeren Grundzustand in einen energiereichen Zustand überführt. Die Absorptionsbanden können entsprechenden Valenzen von Atomgruppen zugeordnet werden. Die durch die Infrarotstrahlung erzeugte Schwingungen ändern das elektrische Dipolmoment der Molekülgruppe. Je polarer die einzelne Gruppe ist, desto intensiver die Absorption der Infrarotstrahlung [107].

Zur Probenvermessung wurde ein „ALPHA FT-IR“-Spektrometer der Firma Bruker verwendet. Dazu wurden 5 mg des zu untersuchenden Lipids auf eine Probenfläche gegeben und automatisch vermessen. Die Identifizierung der funktionellen Gruppen im Lipid fand mit Hilfe des Bandenspektrums statt.

3.12 Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Zur eindeutigen Identifizierung der Lipide über ihre Molekulargewichte, wurde die Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie herangezogen. Das Grundprinzip hierbei ist die Überführung der Moleküle in eine Gasphase, was zu ihrer Ionisierung führt. Nach einer Beschleunigung im elektrischen Feld werden die einzelnen Fragmente einem Analysator zugeführt, der eine Auftrennung nach Masse/Ladungs-Verhältnis durchführt.

Ein Photomultiplier dient letztendlich als Detektor. Die entsprechende Masse des Lipids wurde am Molekülpeak abgelesen [108].

Zur Bestimmung wurden 10 µl der verdünnten Lipidprobe (0,1 µg/ml) in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel injiziert. Die Messungen erfolgten durch einen technischen Assistenten an einem „Q-Trap 2000“ von Applied Biosystems im Labor für Massenspektrometrie im Fachbereich Pharmazie der Universität Marburg.

3.13 Dünnschichtchromatographie

Zur Prüfung der einzelnen Lipidfraktionen kam die Dünnschichtchromatographie zum Einsatz [109]. Hierbei wurde eine DC-Kammer (20 x 15 cm) mit einem Lösungsmittel, das die mobile Phase darstellt, gefüllt. Durch die Zugabe der mobilen Phase (50 ml), sättigte man die Kammer für 30 min. Als stationäre Phase diente eine DC-Platte (Kieselgel 60 F254), die man vollständig in die Kammer stellen konnte. Das Auftragen der einzelnen gelösten Lipidfraktionen erfolgte mithilfe einer feinen Glaskapillare, die nach dem Auftragen mehrmals mit einem Lösungsmittel gereinigt wurde. Nach anschließender Trocknung der Spots an der Luft stellte man die DC-Platte senkrecht in die Kammer. Die vollständige Entwicklung der DC-Platte mit einer Laufstrecke von 10 cm dauerte je nach mobiler Phase 15 - 20 min. Nach Beendigung der Entwicklungszeit besprühte man die DC-Platte mit einem Gemisch aus MeOH/H₂SO₄ (50/50

v/v) und legte sie auf eine Heizplatte (+150 °C), woraufhin gelbliche/bräunliche Spots entstanden. Zusätzlich ist die Auswertung der Spots durch eine Iodkammer möglich. Hierzu werden vereinzelte Iod-Kristalle in eine DC-Kammer gegeben und gewartet bis sich die Kammer mit Dämpfen gesättigt hat. Die DC-Platte wird hineingestellt und für eine kurze Zeit inkubiert. Das Erscheinen von gelblichen Spots auf der Platte ist ein Hinweis für Substanzen. Nach Entnahme der Platte verdampft das Iod und die Spots verblassen.

Zur Auswertung des Chromatogramms diente der Retentionsfaktor (Rf-Wert). Dieser berechnet sich als Quotient aus Laufstrecke der Substanz zur Laufstrecke des Fließmittels vom Startpunkt aus.

3.14 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein häufig angewandter Test zur Messung der Lebensfähigkeit und des Wachstums von Zellen. Es wird die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase lebender Zellen gemessen [110]. Die Aussaat der Zellen in einer 96-Well-Platte fand 24 h vor Durchführung des MTT-Assays statt. Am Tag des Experiments wurden die Zellen mit Lipoplexen, Polyplexen und Lipopolyplexen behandelt und 24 h inkubiert. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 100 µl. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Transfektionsreagenzien abgesaugt und durch 200 µl einer 0,2 mg/ml Lösung von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) ersetzt. Eine dreistündige Inkubation unter Lichtausschluss führte über die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH zu einer Reduktion der gelblichen Substanz zu einem schwerlöslichen violetten Formazan-Salz. Das Lösen der Formazankristalle erfolgte durch Zusatz von 200 µl DMSO. Es bildete sich eine violette Färbung die photometrisch bei 570 nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät (FLUOstar) vermessen wurde.

Zur Berechnung der Zytotoxizität der Testsubstanzen wurden die Messwerte der unbehandelten Kontrollen gleich 100 % gesetzt. Die Blindwerte wurden als arithmetisches Mittel von allen Messwerten subtrahiert.

Das Reagenz Triton-X diente bei dem Versuch als Positivkontrolle, wohingegen unbehandelte Zellen die Negativkontrolle darstellten.

Es fand eine Dreifachbestimmung der Werte statt, d.h. drei Wells wurden mit derselben Probe behandelt.

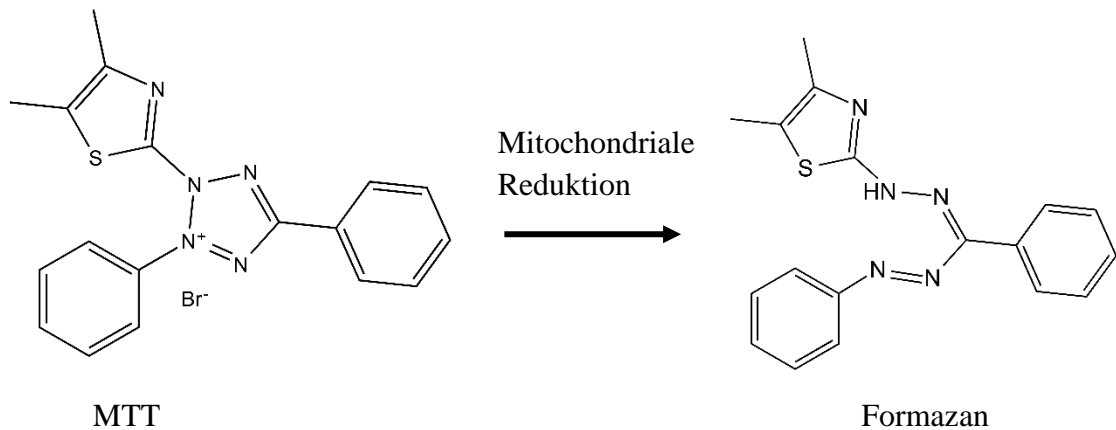


Abbildung 3.10 Farbreaktion des MTT-Salzes zu dem schwer löslichen Formazan-Salz.

Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Reduktion ist abhängig von den mitochondrialen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH.

3.15 LDH-Assay

Der LDH-Assay dient als kolorimetrischer Assay, der die Quantifizierung von extrazellulärer Laktatdehydrogenase nach Membranschädigung ermöglicht. Hierzu wurde das „Cytotoxicity Kit LDH“ (Roche, Mannheim) verwendet. LDH kommt intrazellulär vor und kann aufgrund einer Membranschädigung in das umgebende Medium abgegeben werden. Die Reagenzien des Kits führen zu einer Reduktion von NAD^+ zu NADH, während gleichzeitig Laktat zu Pyruvat oxidiert wird. In einem weiteren Schritt wird ein zugesetztes Tetrazoliumsalz (INT) mittels des Enzyms Diaphorase unter Verbrauch von den Reduktionsäquivalenten zu einem intensiv rot gefärbten, wasserlöslichen Formazansalz umgesetzt (Abbildung 3.11). Die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes zum Formazansalz ist proportional zum Ausmaß der LDH-Freisetzung, welche wiederum mit dem Ausmaß der Zellmembranschädigung korreliert [111].

Am Vortag des Experiments wurden die Zellen (Anzahl: 1×10^4 pro Well) in eine 96-Well-Platte ausplattiert und über Nacht bei $+37^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Am Tag der Versuchsdurchführung entfernte man das Medium und ersetzte es gegen 100 μL der in verschiedenen Konzentrationen im Versuchsmedium vorliegenden Transfektionsreagenzien. Anschließend wurde bei $+37^\circ\text{C}$ für 4 h inkubiert. Als Negativkontrolle diente die natürliche, spontane und nicht durch Testsubstanzen induzierte LDH-Freisetzung. Wohingegen die Positivkontrolle die maximale durch Zelllyse verursachte LDH-Freisetzung angegeben hat.

Nach der Inkubation wurde das Versuchsmedium in eine neue 96-Well-Platte übertragen und anschließend mit 100 µL/Well der frisch hergestellten Reaktionslösung des Kits ergänzt. Diese enthielt das Enzym Diaphorase, NAD^+ , das Tetrazoliumsalz Iodotetrazoliumchlorid (INT) und Natriumlaktat. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur und Schütteln unter Lichtausschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µL/Well der Stopp-Lösung des Kits (0,1 M HCl) gestoppt. Die Auswertung erfolgte am Mikroplatten-Lesegerät bei 490 nm Absorptionswellenlänge und 620 nm Referenzwellenlänge.

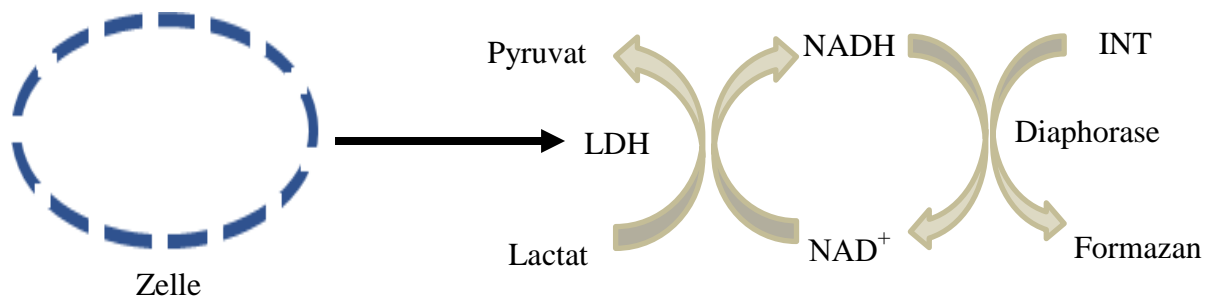


Abbildung 3.11 Reaktionsabfolge eines LDH Assays.

Bei Beschädigung der Plasmamembran wird LDH im Zellkulturmedium freigesetzt. Die freigesetzte LDH kann durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion quantifiziert werden. Zunächst katalysiert LDH die Umwandlung von Laktat in Pyruvat durch die Reduktion von NAD^+ zu NADH . Anschließend wird NADH mit INT durch Diaphorase zu einem roten Formazan-Produkt reduziert. Deshalb ist die Menge des gebildeten Formazan direkt proportional zur Menge der freigesetzten LDH im Medium.

3.16 Transfektion

Die Zellen wurden 24 h vor Durchführung der Transfektionsexperimente in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausplattiert. Dafür löste man die Zellen am Vortag aus einer Petrischale ab, überführte ein geringes Volumen in eine Neubauer-Zählkammer und zählte sie unter einem Lichtmikroskop aus. Die Zellzahl pro Well betrug 1×10^4 , so dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine optische Zellkonfluenz von 70 - 80 % vorlag. Die Zellen wurden über Nacht bei +37 °C und 5 % CO_2 in Kultur gehalten.

Die Proben (Liposomen, Polymere) wurden nach Äquilibrierung auf RT in einem physiologischen Puffer verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Vermischung von Liposomen bzw. Polymeren mit pDNA. Eine Inkubation von 20 min war notwendig, damit sich Lipoplexe bzw. Polyplexe bilden konnten. Für die Herstellung der Lipopolyplexe waren 60 min notwendig. Generell wurden pro Ansatz 2 µg pDNA

(Gesamtvolumen: 75 µl) mit entsprechender Menge an Liposomen bzw. Polymeren (Gesamtvolumen: 75 µl) kondensiert. Aus dem Gesamtansatz (150 µl) wurden 37,5 µl entnommen, jeweils in 3 Wells pipettiert und bis 100 µl mit serum-haltigen Medium verdünnt. Nach 4 h Inkubationszeit ersetzte man das Medium mit frischem serum-haltigen Medium (200 µl) und lies die Zellen 48 h wachsen.

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden die Zellen mit 200 µl PBS Puffer gewaschen und nachfolgend mit 50 µl Lysepuffer für 30 min im Laborschüttler lysiert. 20 µl de Lysats übertrug man in eine weiße 96-Well-Platte, setzte sie in den Mikroplatten-Lesegerät, der durch einen automatischen Pipettiervorgang 50 µl Luciferinsubstrat (470 µM D-Luciferin, 270 µM Koenzym A, 33,3 mM DTT, 530 µM ATP, 1,07 mM H₂CO₃, 4 Mg²⁺ x 5 H₂O, 2,67 mM MgSO₄, 20 mM Tricin, 0,1 mM EDTA) hinzufügte.

Um die optimale Transfektion zu erreichen, wurden für eine Probe mehrere N/P Verhältnisse getestet. Der Faktor N/P gibt dabei das Verhältnis von Stickstoff in dem kationischen Polymer bzw. Lipid zu Phosphat von verwendeter pDNA an. Die Berechnung ist wie folgt:

$$\bullet \quad N/P = \frac{m(\text{PEI})}{43 \text{ g/mol}} * \frac{330 \text{ g/mol}}{m(\text{pDNA})} \quad \text{Formel 3}$$

$$\bullet \quad N/P = \frac{m(\text{DOTAP})}{699 \text{ g/mol}} * \frac{330 \text{ g/mol}}{m(\text{pDNA})} \quad \text{Formel 4}$$

Hierbei ist 330 g/mol für pDNA der Mittelwert des Molekulargewichtes der kleinsten sich wiederholenden Einheit der pDNA und 43 g/mol bzw. 699 g/mol der Mittelwert des Molekulargewichtes der kleinsten sich wiederholenden positiven Einheit des Polymers bzw. des Lipids. Da mit einer Gesamtmasse von 2 µg pDNA (siehe oben) gearbeitet wurde, berechnet sich die Menge an Liposomen bzw. Polymeren wie folgt:

$$\bullet \quad m(\text{PEI}) = N/P * m(\text{pDNA}) * \frac{43 \text{ g/mol}}{330 \text{ g/mol}} \quad \text{Formel 5}$$

$$\bullet \quad m(\text{DOTAP}) = N/P * m(\text{pDNA}) * \frac{699 \text{ g/mol}}{330 \text{ g/mol}} \quad \text{Formel 6}$$

3.17 Bestimmung des Proteingehalts (Pierce BCA Protein Assay)

Als Bezugsgröße für die Luciferaseaktivität wurde der Proteingehalt der Zellen nach der Transfektion verwendet. Hierzu wurden 20 µl des Zelllysats in eine transparente 96-Well Platte übertragen und mit 200 µl einer Mischung aus Reagenz A und Reagenz B (1:20) ergänzt und 30 min in einen Laborschüttler bei +37 °C gestellt. Das Prinzip dieses Assays zur Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} -Ionen in alkalischem Milieu in der Anwesenheit von Proteinen. Je zwei Moleküle des Nachweisreagenzes, der 2,2-Bichinoly-4,4-dicarbonsäure, können mit einem Cu^{1+} - Ion einen wasserlöslichen Komplex bilden, der sich durch eine starke Absorption bei 562 nm auszeichnet (Abbildung 3.12) [112].

Dementsprechend konnte die Violettfärbung der Probe nach erfolgter Reaktion photometrisch (bei 562 nm) bestimmt werden. Da über einen weiten Bereich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Grad der Färbung und dem Proteingehalt besteht, konnte aus dem Extinktionswert der Proteingehalt der Probe berechnet werden. Zur Ermittlung des genauen Proteingehalts wurde ebenso eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin erstellt. Durch die lineare Beziehung zwischen der Absorption und Konzentration des Standards konnte der unbekannte Proteingehalt innerhalb des Wells ermittelt werden.

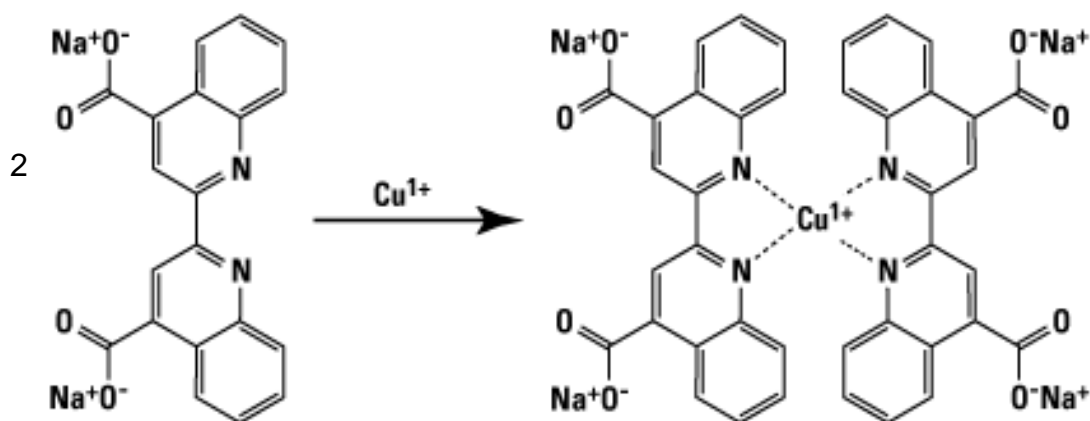


Abbildung 3.12 Darstellung der Farbreaktion des BCA Assays.

Je zwei Moleküle des Nachweisreagenzes, der 2,2-Bichinoly-4,4-dicarbonsäure, können mit einem Cu^{1+} - Ion einen wasserlöslichen Komplex bilden, der sich durch eine starke Absorption bei 562 nm auszeichnet.

3.18 Interkalationsassay

Die Komplexierung der pDNA durch kationische Liposomen bzw. kationische Polymere verhindert die Interkalation des Fluoreszenzmarkers GelRed™ in den pDNA-Doppelstrang. Das Messen der GelRed™/pDNA-Fluoreszenz kann daher als Maß der pDNA-Komplexierung genutzt werden [113].

Für den Versuch wurden Liposomen, Polyplexe und Lipopolyplexe frisch hergestellt. Eine Komplexierung der Reagenzien mit pDNA erfolgte wie bei den Transfektionsstudien (Kapitel 3.16). Nach einer 20 minütigen Inkubation der Komplexe, übertrug man 37,5 µl in jeweils ein Well einer weißen 96-Well-Platte. Die Menge an pDNA pro Well betrug 0,5 µg). Die Wells der Platte enthielten 62,5 µl einer Gel-Red™-Lösung (1:10000 in HEPES). Nach einer kurzen Durchmischung erfolgte eine Inkubation der Platte unter Lichtausschluss für 5 min.

Die weiße Platte wurde in ein Mikroplatten-Lesegerät eingeführt und die Fluoreszenz der einzelnen Wells bei 600 nm gemessen.

Als Positivkontrolle wurde reine pDNA eingesetzt und die Negativkontrolle entsprach HEPES-Puffer (pH 7,4). Die prozentuale Menge an freier pDNA, also unkomplexiert, wurde bei der Auswertung auf der y-Achse des Balkendiagramms aufgetragen.

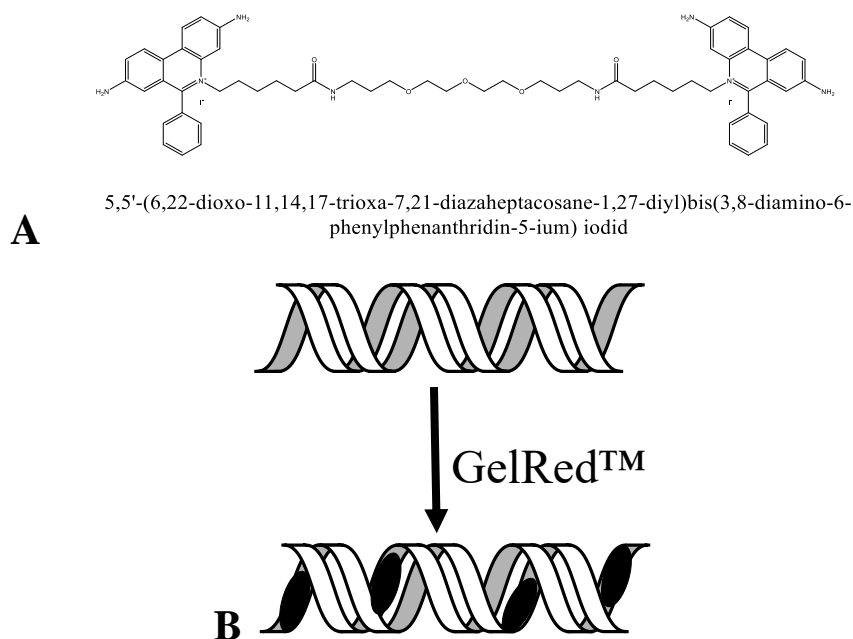


Abbildung 3.13 Strukturformel von GelRed™ (A) und Interkalation (schwarze Markierungen) mit pDNA (B)

3.19 Agarose-Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Bestimmung der Polyplexe und Lipopolyplexe zur Testung der Stabilitäten in Heparin nahm man eine Agarosekonzentration von 0,8 % in 1 x TAE. Für die Herstellung des Gels suspendierte man 0,8 g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer. Die Suspension ging bei einer Erhitzung in einer Mikrowelle in eine Lösung über. Nach Abkühlung der Lösung auf +65 °C pipettierte man der Lösung Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,1 µg/ml) hinzu und goss das flüssige Gel in einen Gelträger mit Probenkamm. Nach 20 Minuten war das Gel auspolymerisiert. Der Kamm wurde entfernt und das feste Gel in die Kammer gesetzt, welche mit 1x TAE-Puffer gefüllt war. Die Transfektionsreagenzien wurden wie oben beschrieben (Kapitel 3.4) hergestellt. Bevor man jedoch die Reagenzien in die Taschen des Agarosegels pipettierte, vermischte man sie mit 1 µl Ladepuffer. Dies diente zur Erhöhung der Dichte der Probe und führte somit zu einem besseren Absinken in die Taschen des Gels. Die Dauer der Gelelektrophorese betrug 1 h bei +80 V. Nach Beendigung des Vorgangs überführte man das Agarosegel vorsichtig in eine UV-Kammer, wo man es anschließend zur Dokumentation unter UV-Licht (302 nm) fotografierte [114].

Die Herstellung der getesteten Polyplexe und Lipopolyplexe erfolgte nach den beschriebenen Methoden (Kapitel 3.4). Die Menge an pDNA in einer Tasche des Gels betrug 0,5 µg.

4 Ergebnisse

Das folgende Kapitel der Dissertation beschäftigt sich detailliert mit den Versuchsergebnissen bzgl. Lipidextraktion, Messung von physikochemischen Eigenschaften, Stabilitätsmessungen in verschiedenen pH-Werten, Alveofact® und Heparin sowie Transfektionseffizienz und Zelltoxizitäten von tetraetherlipidhaltigen Liposomen, Lipoplexen und Lipopolyplexen. Die Ergebnisse sind in chronologischer Reihenfolge bzgl. der Durchführung beschrieben.

Tetraetherlipide, die für die Herstellung von Transfektionsreagenzien genutzt werden sollen, müssen eine möglichst hohe Reinheit (keine Begleitsubstanzen) besitzen. Hierzu wurden verschiedene Analysetechniken wie DC, HPLC, NMR- und IR-Spektroskopie angewendet. Des Weiteren sind Versuche wichtig, bei denen man die Fähigkeit der Tetraetherlipide zur Liposomenbildung untersucht und bzgl. des Einsatzes als Transfektionsmittel beurteilt.

Ein eigenes „Scoring Systems“ --- bis +++ (3 x minus bis 3 x plus) in Hinblick auf möglichen Einsatz als Transfektionsreagenz diene als Grundlage für das weitere Vorgehen. Parameter wie Größe, Zetapotential und PDI dienen als Bewertungsmaßstab. Da die vorliegende Dissertation auf die Entwicklung eines Transfektionsreagenzes für die orale Gentherapie abzielt, wurden für ausgewählte Liposomen, Lipoplexe und Lipopolyplexe die Stabilitäten in Pufferlösungen verschiedener pH-Werte bestimmt. Um die Integrität der hergestellten pDNA-Komplexe zu beurteilen diene eine Stabilitätsmessung in wässriger Heparinlösung mittels Gelelektrophorese

Die morphologischen Eigenschaften der Liposomen, Lipoplexe und Lipopolyplexe wurden mit gängigen Methoden wie Rasterkraftmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie, und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

4.1 Isolierung und Aufreinigung von Tetraetherlipiden

4.1.1 TEL (Soxhlet-Extrakt)

Die Lipidfraktion, die aus der Rohmasse durch Soxhlet-Extraktion erhalten wurde, stellte eine tiefbraune/schwarze klebrige Masse mit charakteristischem „würzigen“ Geruch dar. Die Auswertung der Lipidfraktion mithilfe einer DC-Platte, bestehend aus Kieselgel und einem

Lösungsmittelgemisch, bestehend aus $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65/30/5 v/v/v), als mobile Phase, ergab 12 Spots über die gesamte Laufstrecke von 10 cm. Bei zusätzlicher Betrachtung der DC-Platte unter UV-Licht (280 nm) wurden ebenfalls diverse Spots sichtbar. Die Vielzahl an Spots deuten auf polare und unpolare Substanzen hin, die mit dem Extraktionsmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (50/50 v/v) aus der Rohmasse extrahiert wurden (Abbildung 4.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TEL Lipidfraktion ein unreines, heterogenes Produkt darstellt, das in den nachfolgenden Schritten konsekutiv aufgereinigt wurde. Dies ermöglicht Liposomen mit einer definierten Zusammensetzung zu produzieren. Es erlaubt darüber hinaus auch die Berechnung des molaren Anteils des Lipids in der liposomalen Formulierung.

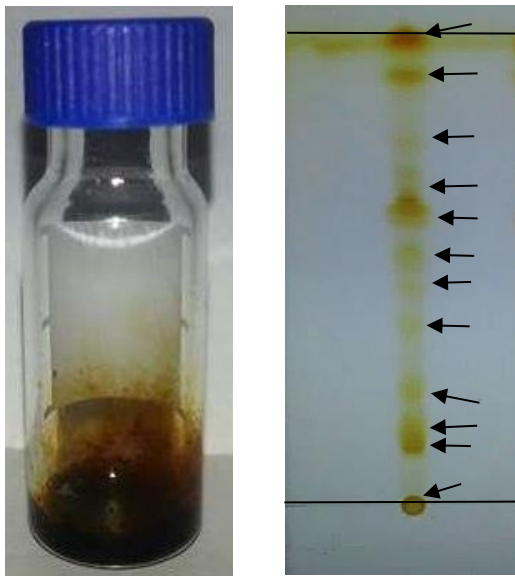


Abbildung 4.1 TEL (links) und die entsprechende Analyse per DC (rechts).

Rechts: HPTLC von TEL mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65/30/5 v/v/v) als mobile Phase und Kieselgel als stationäre Phase. Die TEL Lipidfraktion stellt eine relativ feste Substanz dar, die aufgrund mehrerer Verunreinigungen tiefbraun/schwarz gefärbt ist. Mehrere Spots innerhalb der Laufstrecke verdeutlichte die erhöhte Anzahl an Nebenprodukten (wie z.B. Pigmente, Squalen etc.). Zur Entwicklung wurde die DC-Platte mit einem Reagenz aus $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (50/50 v/v) besprüht und auf eine Heizplatte (+160 °C) gelegt bis sich braune Spots bildeten.

4.1.2 Polare Lipidfraktion E (PLFE)

Zur Vermeidung von mehreren Begleitsubstanzen wurde der zuvor gewonnene Soxhlet-Extrakt auf eine selbstgepackt Kieselgelsäule gegeben und nachfolgend aufgereinigt. Die hohe Polarität des ersten Eluenten MeOH/H₂O (50/50 v/v) führte dazu, dass hauptsächlich Pigmente abgetrennt wurden. Sie zeigten typische Fluoreszenzeigenschaften bei Bestrahlung der DC-Platte unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 220 nm bzw. 340 nm. Die erniedrigte Polarität des zweiten Eluenten CHCl₃/MeOH/H₂O (22,5/55/22,5 v/v/v) brachte schließlich die Elution von der polaren Lipidfraktion E (PLFE), die charakteristisch gelblich gefärbt war. Der Eluent CHCl₃/MeOH/H₂O (70/26/4 v/v/v) isolierte wieder polare Pigmente, die keine weitere Relevanz für die vorliegende Arbeit hatten. Die abschließende Analyse von PLFE mit Hilfe einer DC-Kieselgelplatte (HPTLC) ergab einen R_f-Wert von 0,2, der mit Literaturwerten ziemlich genau übereinstimmte.

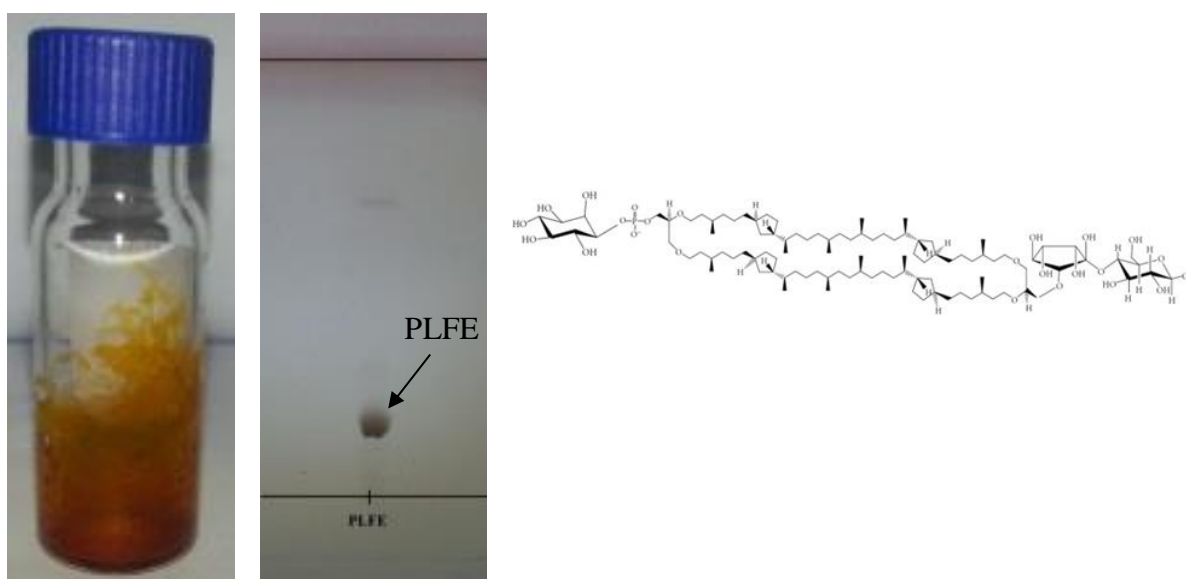


Abbildung 4.2 PLFE (links) und die entsprechende Analyse per DC (rechts).

HPTLC von PLFE erfolgte mit CHCl₃/MeOH/H₂O (70/26/4 v/v/v) als mobile und Kieselgel als stationäre Phase. Die PLFE Fraktion stellt eine waxartige, klebrige Substanz dar, die aufgrund eines geringen Pigmentanteils rötlich/gelblich gefärbt ist. Aufgrund der hydrophilen Struktur von PLFE (beidseitige Zuckergruppen), ist zur Lösung des Lipids eine polare Mischung aus CHCl₃/MeOH/H₂O (70/26/4 v/v/v) notwendig. Diese Mischung diente auch als mobile Phase zur Beurteilung der Lauffähigkeit des Lipids auf einer HPTLC-Platte (rechts). Zur Detektion des Spots wurde die DC-Platte mit einem Gemisch aus H₂SO₄/MeOH (50/50 v/v) besprüht und zur Entwicklung auf eine Heizplatte gelegt (+160 °C) bis sich braune Spots bildeten. Der resultierende R_f-Wert betrug 0,2.

4.1.3 Hydrolysierte Tetraetherlipide (*hGDNT* und *hGDGT*)

Hydrolysierte Tetraetherlipide, das sind Tetraetherlipide nach Abspaltung der Zucker- und Phosphatgruppen, sind prädestiniert für die Lipoplexbildung. Aufgrund der fehlenden negativen Ladung besitzen sie eine höhere Komplexierungsneigung mit pDNA.

Durch den Einsatz des ersten Eluenten CHCl_3 konnten unpolare Substanzen wie Pigmente (orange gefärbtes Band in der Kieselgelsäule) abgetrennt werden. Die zweite Fraktion, eluiert mit CHCl_3/DE (80/20 v/v), brachte das weniger unpolare *hGDGT* hervor. Das Lösungsmittelgemisch $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10 v/v), welches man im letzten Schritt einsetzte, brachte das Lipid *hGDNT*. Anschließend erfolgte zur Aufreinigung noch eine Kalt-Aceton-Präzipitation. Dies führte letztendlich zu einer gelblichen harzartigen Substanz. Das hydrolysierte Lipid *hGDNT* wurde mit HPTLC analysiert, bei der Kieselgel als stationäre Phase und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10 v/v) als mobile Phase diente. Die Entstehung eines Spots bei einem R_f -Wert von 0,2 weist auf das aufgereinigte Lipid hin.

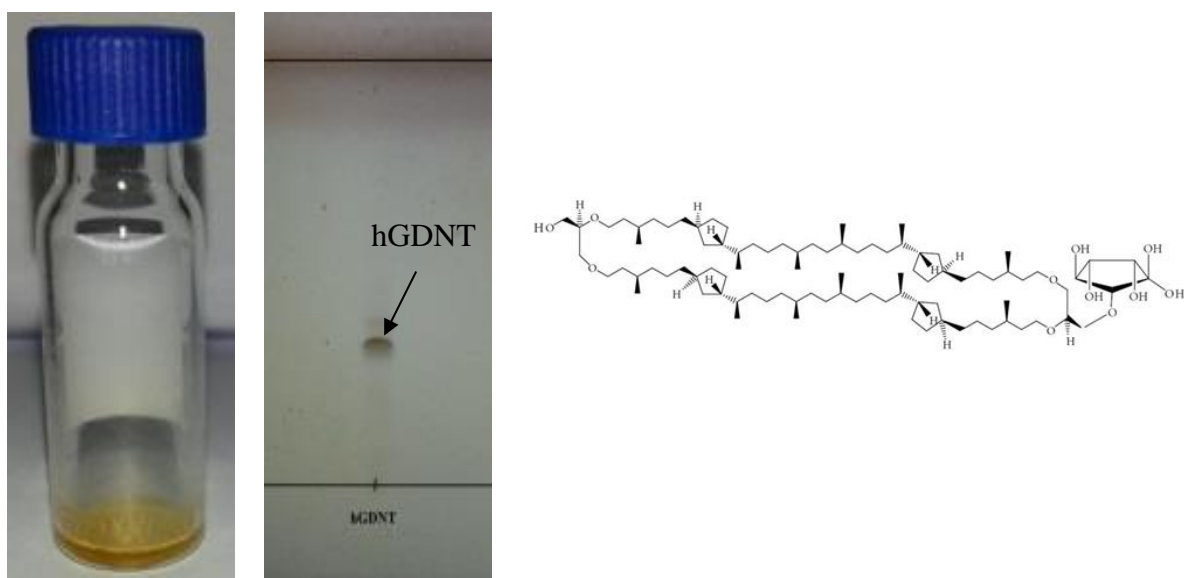


Abbildung 4.3 *hGDNT* (links) und die entsprechende Analyse per DC (rechts).

HPTLC von *hGDNT* erfolgte mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10 v/v) als mobile Phase und Kieselgel als stationäre Phase. Das isolierte und aufgereinigte hydrolysierte Tetraetherlipid *hGDNT* (keine Zuckergruppen), stellt eine gelbliche waxartige Substanz dar. Die Lösung erfolgte in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10 v/v) und resultierte bei Durchführung einer Dünnschichtchromatographie auf einer HPTLC Platte in einem R_f -Wert von 0,3. Zur Detektion des Spots, wurde die DC-Platte mit einem Gemisch aus $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (50/50 v/v) besprüht bis sich braune Spots bildeten.

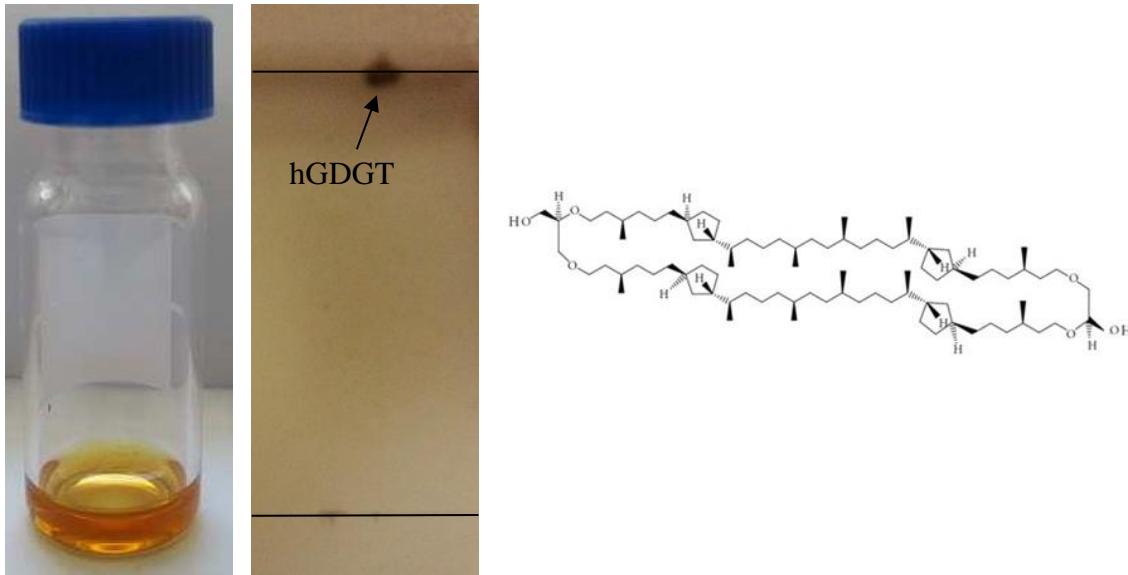


Abbildung 4.4 hGDGT (links) und die entsprechende Analyse per DC (rechts).

HPTLC von hGDGT erfolgte mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10 v/v) als mobile Phase und Kieselgel als stationäre Phase. Das isolierte und aufgereinigte hydrolysierte Tetraetherlipid hGDGT (keine Zuckergruppen), stellt eine gelbliche waxartige Substanz dar. Die Lösung erfolgte in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10 v/v) und resultierte bei Durchführung einer Dünnschichtchromatographie auf einer HPTLC Platte in einem R_f -Wert von 0,95. Zur Detektion des Spots wurde die DC-Platte mit einem Gemisch aus $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (50/50 v/v) besprüht bis sich braune Spots bildeten.

4.1.4 Halbsynthetisches Tetraetherlipid (MI-0907)

Die Intention zur Herstellung eines halbsynthetischen Tetraetherlipids bestand darin, die Vorteile des klassischen Tetraetherlipids (Säurestabilität) mit dem Vorteil einer zusätzlichen ergänzten positiven Ladung zu erhöhen. Durch Anbringung einer positiven Ladung wird die Lipoplexbildung mit negativ geladener pDNA erleichtert.

Die Ausbeute nach der Säulenreinigung von MI-0907 betrug 30 mg, was eine relative Ausbeute von 46,98 % bedeutete. Vermutlich liegt die Verbindung als 2 x Acetat vor, da Essigsäure im Laufmittel der finalen Säulenreinigung enthalten war. Demzufolge wäre das Molekulargewicht um 120 Da höher als das theoretische Molekulargewicht, also ca. 1756,8 Da. Dieses höhere Molekulargewicht muss man für die Konzentrationsberechnung für die Liposomenherstellung miteinbeziehen. Es gibt mehrere Signale im ESI-MS, die auf eine gewisse Heterogenität der Probe hinweisen. Es fliegen bei dem Produkt nur die doppelt geladenen Ionen. Ein Molpeak wurde nicht erhalten (Abbildung 4.10).

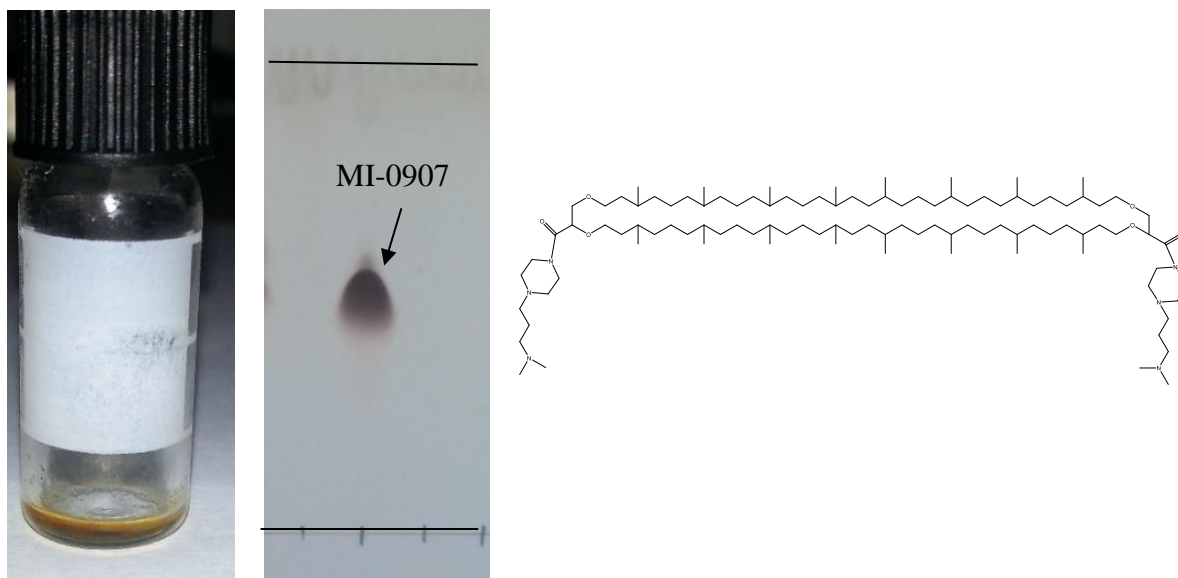


Abbildung 4.5 MI-0907 (links) und die entsprechende Analyse per DC.

HTPLC von MI-0907 erfolgte mit DCM/MeOH (80/20 v/v) als mobile Phase und Kieselgel als stationäre Phase. Das isolierte und aufgereinigte Tetraetherlipid MI-0907 stellt ebenso wie die anderen isolierten Lipide eine gelbliche waxartige Substanz dar. Die Lösung erfolgte in DCM/MeOH (80/20 v/v) und resultierte bei Durchführung einer Dünnschichtchromatographie auf einer HPTLC Platte in einem Rf-Wert von 0,55. Zur Detektion des Spots wurde die DC-Platte mit einem Gemisch aus H₂SO₄/MeOH (50/50 v/v) besprüht und anschließend auf einer Heizplatte (+160 °C) gelegt bis sich braune Spots bildeten.

Tab. 10 Ausbeuten der Tetraetherlipide.

Hierbei wurden die erhaltenen Lipidmassen, auf die Einwaagen der gefriergetrockneten Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* bzw. des Ausgangsmaterials für die Synthese von MI-0907, bezogen. TEL ist die Lipidfraktion aus der Soxhlet-Extraktion wohingegen PLFE durch zusätzliche Aufreinigung mit einer Chromabond C-18 Säule erhalten wurde. hGDNT und hGDGT stellen hydrolysierte Tetraetherlipide dar. Die Ausbeute des Lipids MI-0907 ist relativ hoch, da hier die Ausgangsverbindung „Caldarchaeol-Dicarbonsäure“ bereits vorlag.

Tetraetherlipid	Ausbeute (% von Ausgangsmasse)	Vergleich Literatur
TEL (Soxhlet Extrakt)	8,32	10,1 [115]
PLFE	3,17	2,5 [116]
hGDNT	1,95	1,9 [117]
hGDGT	3,20	2,1 [117]
MI-0907	46,98	-

4.2 Analytik von Tetaetherlipiden

Der nachfolgende Abschnitt beschäftigt sich mit der instrumentellen Analytik der zuvor aufgereinigten Tetraetherlipide. Die Analytik von TEL (Soxhlet Extrakt) ist nicht notwendig, da es sich hierbei um ein unreines Produkt mit mehreren Begleitsubstanzen handelt (Abbildung 4.1). Stattdessen steht das Tetraetherlipid hGDNT aufgrund seines günstigen Packungsparameters und Ladung im Vordergrund.

Die Massenspektrometrie (ESI-MS) von hGDNT zeigte ein scharfes Signal bei m/z 1479, das auf das $[M+Na]^+$ -Ion hindeutet. Ein weiteres charakteristisches Signal befindet sich bei m/z 740, welches das $[M+Na]^{2+}$ -Ion darstellt (Abbildung 4.6).

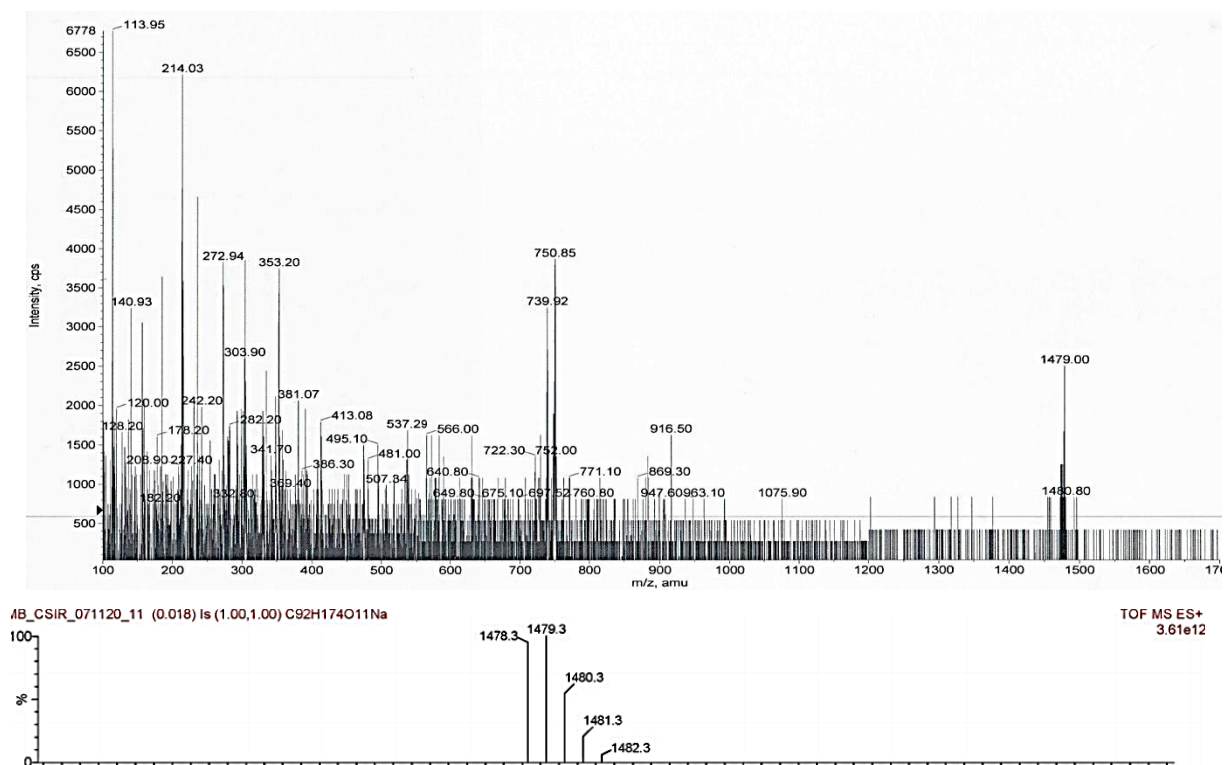


Abbildung 4.6 ESI-MS Spektrum von hGDNT (oben) und Vergleich mit Bode *et al.* [117] (unten). Zur Bestimmung wurden 10 μ l des verdünnten Tetraetherlipids hGDNT (0,1 μ g/ml) in einem leicht flüchtigen LM injiziert. Die Messungen erfolgten durch einen technischen Assistenten an einem „Q-Trap 2000“ von Applied Biosystems im Labor für Massenspektrometrie im Fachbereich Pharmazie. Es zeigte sich ein scharfes Signal bei m/z 1479, das auf das $[M+Na]^+$ -Ion hindeutet. Ein weiteres charakteristisches Signal befindet sich bei m/z 740, welches das $[M+Na]^{2+}$ -Ion darstellt

Das IR Spektrum (Abbildung 4.7) veranschaulicht die funktionellen Gruppen von hGDNT. Eine breite Bande bei 3376 cm^{-1} entsprechen -OH Gruppen. Zwei scharfe Banden bei 2921 cm^{-1} und 2854 cm^{-1} zeigen -CH, -CH₂, und -CH₃ Gruppen. Banden bei 1460 cm^{-1} und 1276 cm^{-1} weisen auf -CH₂, und -CH₃, Gruppen hin. -C-O-C- (Ether) und -C-O-H (hydroxyl) Gruppen wurden durch Banden bei 1102 cm^{-1} und 1085 cm^{-1} identifiziert. Eine scharfe Bande bei 758 cm^{-1} weist auf die typische C-H Schwingung hin. ¹H-NMR Spektrum von hGDNT ist in enger Übereinstimmung zu Lo *et al.* [56].

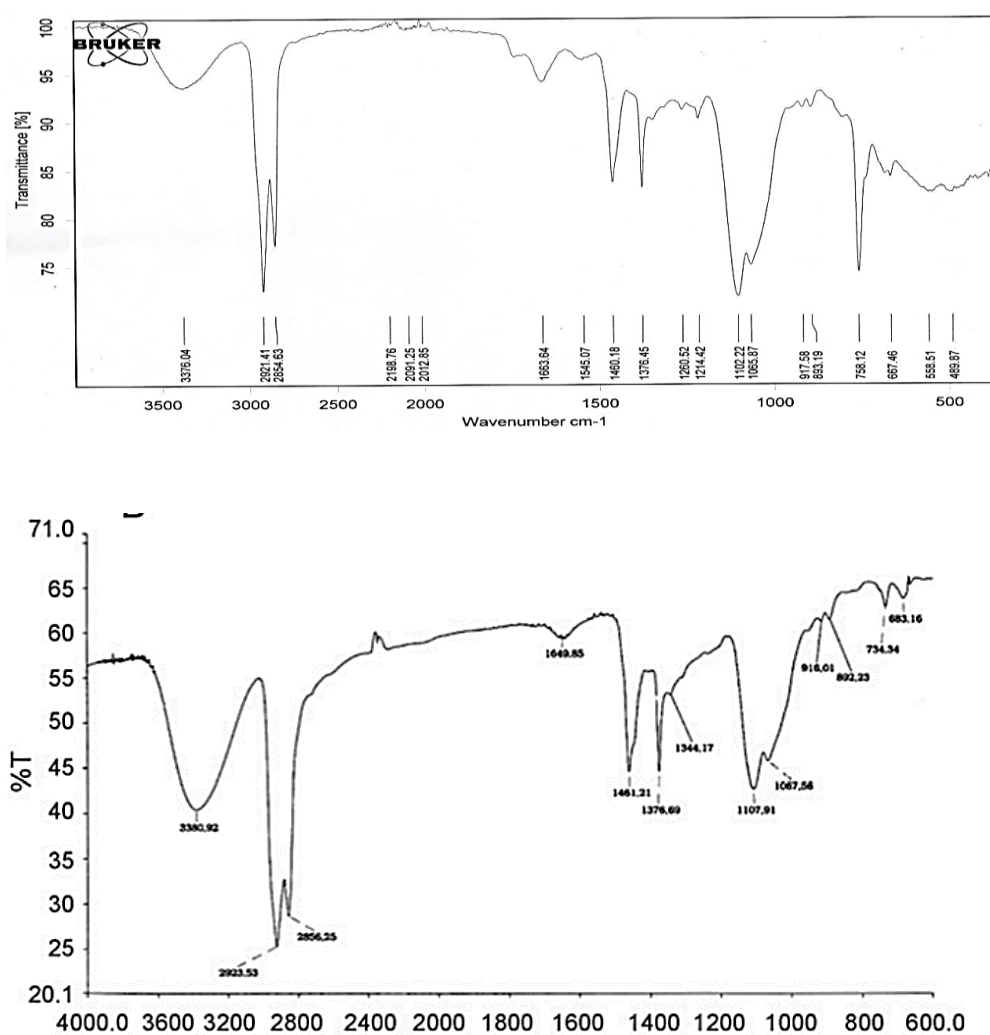


Abbildung 4.7 IR-Spektrum von hGDNT (oben) und Vergleich mit Parmentier *et al.* [118] (unten). Zur Probenvermessung wurde ein „ALPHA FT-IR“ Spektrometer der Firma Bruker verwendet. Eine Lipidmenge von 5 mg war für die Messung ausreichend. Das Bandenspektrum diente zur Identifizierung der funktionellen Gruppen. Eine breite Bande bei 3376 cm^{-1} entsprechen -OH Gruppen. Zwei scharfe Banden bei 2921 cm^{-1} und 2854 cm^{-1} zeigen -CH, -CH₂ und CH₃ Gruppen. Banden bei 1460 cm^{-1} und 1276 cm^{-1} weisen auf -CH₂ und -CH₃ Gruppen hin. -C-O-C- (Ether) und -C-O-H (hydroxyl) Gruppen entsprachen Banden bei 1102 cm^{-1} und 1085 cm^{-1} . Eine scharfe Bande bei 758 cm^{-1} weist auf die typische C-H Schwingung hin.

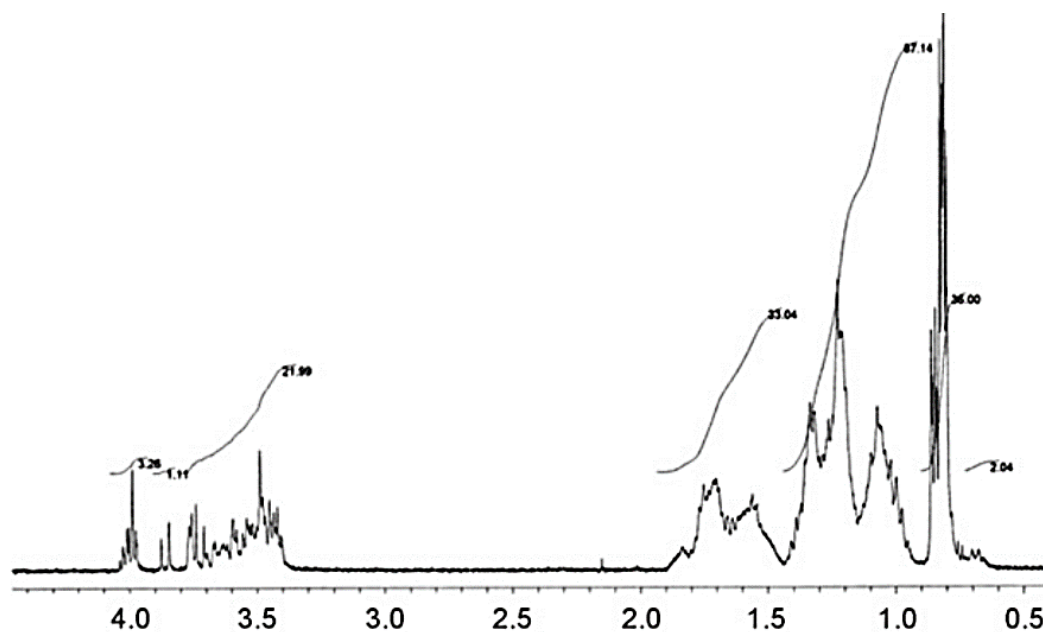
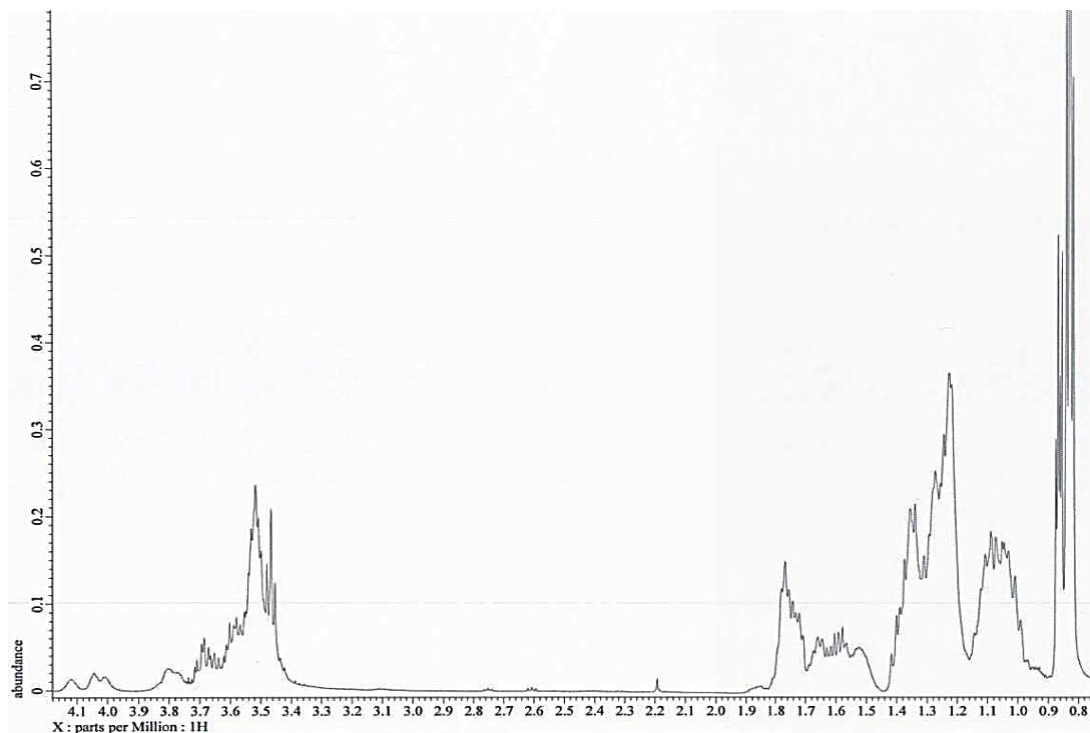


Abbildung 4.8 ^1H NMR Spektrum von hGDNT und Vergleich mit Parmentier *et al.* [118] (unten). Zur Analyse des Lipids wurden ca. 5 mg Lipid in ein Probenröhrchen gegeben und mit deuteriertem Chloroform verdünnt. Die Messung fand an einem „JEOL ECX-400“ mit Autotune-Probenkopf statt. Durch charakteristische Signale bei δ 0,7-0,9 ($-\text{CH}_3$), 0,95-1,4 ($-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$), 1,45-1,9 (zyklopentyl $-\text{CH}$), 3,4-4,05 ($-\text{O}-\text{CH}$, $-\text{O}-\text{CH}_2$) konnte das Lipid identifiziert werden.

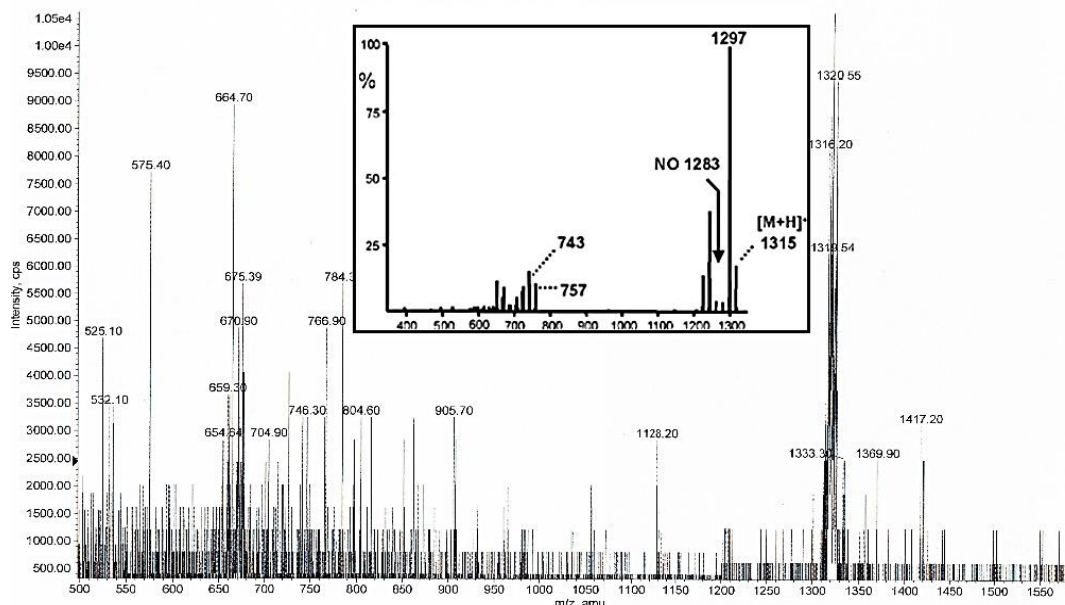


Abbildung 4.9 ESI-MS Spektrum von hGDGT und Vergleich mit Knappy *et al.* [119] (Einsatz).

Zur Bestimmung wurden 10 µl des verdünnten Tetraetherlipids hGDGT (0,1 µg/ml) in einem leicht flüchtigen LM injiziert. Die Messungen erfolgten durch einen technischen Assistenten an einem „Q-Trap 2000“ von Applied Biosystems im Labor für Massenspektrometrie im Fachbereich Pharmazie. Es zeigte sich ein scharfes Signal bei m/z 1320, das auf das $[M+Na]^+$ -Ion hindeutet. Theoretische Masse von hGDGT beträgt 1297 g/mol. Weitere charakteristische Signale bei m/z 664 für das $[M+2Na]^{2+}$ -Ion.

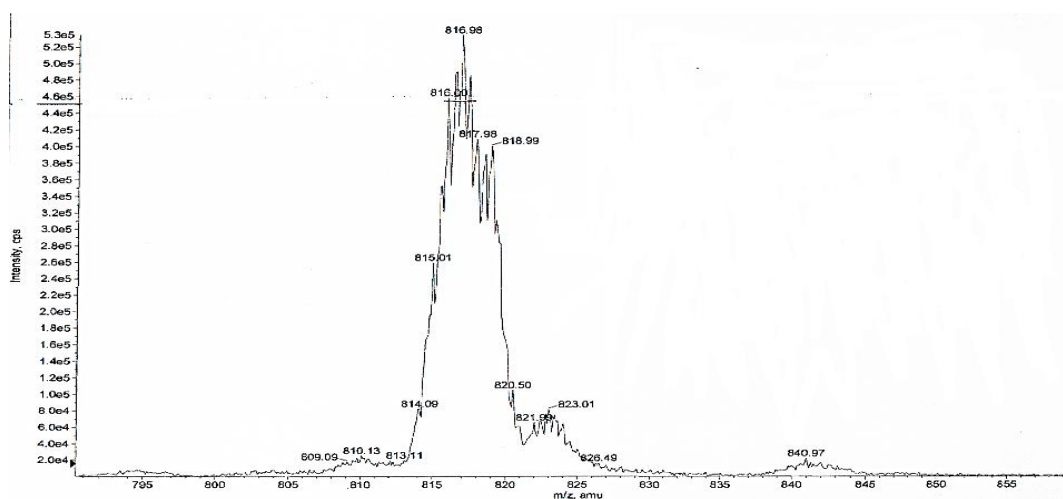


Abbildung 4.10 ESI-MS Spektrum von MI-0907.

Zur Bestimmung wurden 10 µl des verdünnten Tetraetherlipids MI-0907 (0,1 µg/ml) in einem leicht flüchtigen LM injiziert. Ein Molpeak war im Vergleich zu den vorherigen Messungen z.B. bei hGDNT und hGDGT nicht zu erkennen. Es gab lediglich ein prominentes Signal bei m/z 816,98.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Isolierung, Aufreinigung bzw. Synthese aller fünf Tetraetherlipide TEL (Soxhlet-Extrakt), PLFE, hGDNT, hGDGT und MI-0907 erfolgreich war. Ähnliche Ausbeuten wurden bereits in früheren Publikationen erreicht. Ein allgemeines Merkmal der Massenspektren von Tetraetherlipiden ist das niedrige oder fehlende (bei MI-0907) Signal für den Molpeak. Diese Abwesenheit lässt sich sehr gut durch die hohe Anzahl der Protonen im Molekül erklären. Dadurch erhält man eine Vielzahl an Spaltprodukten, jedoch kein komplettes Produkt im Spektrum.

4.2 Physikochemische Charakterisierung von Liposomen

Die zuvor extrahierten Lipidfraktionen TEL, PLFE, hGDNT, hGDGT und MI-0907 dienen zur Herstellung von Liposomen mittels Filmmethode. Physikochemische Eigenschaften der Liposomen wie Durchmesser, Zetapotential und PDI waren ausschlaggebend für eine Bewertung an Hand eines Scoring-Systems (von --- bis +++) bzgl. des Einsatzes als Transfektionsmittel zur oralen Gentherapie.

Der Größenbereich der hergestellten Liposomen erstreckte sich von $108,2 \pm 9,5$ nm, im Falle von DOTAP (100 mol) und $250,3 \pm 23,2$ nm bei Liposomen aus DPPC (100 mol). Beide Liposomenformulierungen unterschieden sich auch bzgl. ihres Zetapotentials. DOTAP (100 mol) hatte die höchste positive Ladung von $+43,2 \pm 4,1$ mV wohingegen DPPC (100 mol) eine leicht negative Ladung von $-9,8 \pm 2,1$ mV zeigte. Eine Beimischung von TEL oder PLFE führte in den Formulierungen, mit geringem Anteil an DOTAP zu stark negativen Potentialen von $-30,9 \pm 5,6$ mV bei TEL/DPPC (10/90 mol/mol) und $-43,3 \pm 1,7$ mV bei PLFE /DPPC/DOTAP (70/10/20 mol/mol/mol). Ein äquivalenter Anteil von TEL und DOTAP in Liposomen wie bei TEL/DOTAP (50/50 mol/mol) war nicht möglich und führte bei Hydratisierung des Lipidfilms zu größeren Präzipitaten.

Die Beimischung des neutralen Lipids hGDNT sorgte nicht nur für positive Zetapotentiale sondern auch für einen Durchmesser von $147,8 \pm 13,5$ nm, wie es bei der Formulierung hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol) zu sehen ist. Eine zusätzliche Beimischung von CH in der Formulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) brachte Liposomen mit einem Zetapotential $-12,8 \pm 2,6$ mV hervor, die neben weiteren Formulierungen zur Bildung von Lipopolyplexen benutzt werden.

Die Formulierung hGDGT/DPPC/DOTAP (15/70/15 mol/mol/mol) zeigte einen großen Durchmesser von $351,4 \pm 23,2$ nm und einen hohen PDI-Wert von 0,4. Diese Formulierung bzw. das Tetraetherlipid war für weitere Experimente nicht relevant.

Die Benutzung des neuartigen Lipids MI-0907 in der Formulierung MI-0907/DPPC (25/75 mol/mol) führte zu einem positiven Oberflächenpotentials von $+33,4 \pm 6,6$ mV.

Ein hoher PDI und ein großer Liposomendurchmesser deuten auf eine Fusion/Aggregation der Vesikel hin. Ebenso ist es möglich, dass es zu einer Phasenseparation der Komponenten gekommen ist. Es könnte auch sein, dass eine Formierung von kleineren Liposomen nicht möglich ist.

Um dies zu vermeiden wird in weiteren Versuchen nur mit aufgereinigten Fraktionen wie hGDNT und dem halbsynthetischen Lipid MI-0907 gearbeitet. Beide Lipide sind aufgrund ihrer neutralen bzw. positiven Ladung besonders gut für den Gentransfer geeignet, da sie pDNA effektiver komplexieren können als negativ geladene Lipide wie PLFE. Die Lipidfraktion hGDGT fällt ebenso als Vektor aus, da dieses Molekül keinen geeigneten Packungsparameter aufweist, der eine Formierung von Liposomen ermöglicht [59]. Somit ist das Scoring vor allem für neutrale und positiv geladene Liposomen höher als für negativ geladene Liposomen.

Ein hohes Scoring (+++) haben vor allem Liposomen erhalten, die sowohl ein positives Zetapotential als auch einen niedrigen PDI-Wert aufweisen. Zudem wurde drauf geachtet, dass der Anteil an Tetraetherlipiden nicht zu hoch ist, da sonst die Liposomenbildung und der „Release“ der komplexierten pDNA innerhalb der Zelle erschwert wird. Ein hoher Anteil an Tetraetherlipiden macht die Liposome zu stabil und ist nicht erwünscht.

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Liposomenformulierung hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol), MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) und hGDNT/DOTAP (15/85 mol/mol) ausgewählt. Hinzu kam ebenfalls die Formulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) trotz negativem Zetapotentials.

Tab. 11 Zusammensetzung und physikochemische Eigenschaften von Liposomen.

Formulierung (molars Verhältnis)	Partikelgröße ± SD [nm]	PDI	Zetapotential [mV]	Scoring
DPPC (100)	250,3 ± 23,2	0,4	-9,8 ± 2,1	---
DOTAP (100)	108,2 ± 9,5	0,2	+43,2 ± 4,1	+++
TEL/DPPC (10/90)	126,3 ± 15,9	0,4	-30,9 ± 5,6	---
TEL/DOTAP (50/50)	-	-	-	---
TEL/DPPC/DOTAP (70/10/20)	277,0 ± 54,8	0,3	-45,2 ± 1,3	---
TEL/DPPC/DOTAP (15/30/55)	145,6 ± 13,3	0,3	+33,7 ± 3,6	+++
PLFE /DPPC/DOTAP (70/10/20)	121,7 ± 21,1	0,2	-43,3 ± 1,7	---
PLFE/DOTAP (5/95)	105,6 ± 10,5	0,2	+38,1 ± 4,0	-
PLFE/DOTAP (15/85)	120,4 ± 14,4	0,2	+41,7 ± 4,1	+++
hGDNT/DPPC/CH (20/55/25)	127,8 ± 16,0	0,3	-12,8 ± 2,6	+++
hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25)	147,8 ± 13,5	0,2	+31,7 ± 4,4	+++
hGDNT/DOTAP (5/95)	101,3 ± 11,6	0,2	+40,9 ± 4,5	-
hGDNT/DOTAP (15/85)	115,4 ± 14,7	0,3	+42,8 ± 5,3	++
hGDGT/DPPC/DOTAP (15/70/15)	351,4 ± 43,2	0,4	+28,7 ± 10,8	+
MI-0907/DPPC (25/75)	112,3 ± 13,5	0,3	+33,4 ± 6,6	++
MI-0907/DPPC/CH (20/55/25)	150,5 ± 11,9	0,2	+27,4 ± 4,1	+++

Tab. 12 Zusammensetzung und physikochemische Eigenschaften von Lipopolyplexen.

Drei ausgewählte liposomale Formulierungen hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol), MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) und hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) wurden jeweils in einer Gesamtlipidkonzentration von 6 mg/ml hergestellt. Zur Herstellung von Lipopolyplexen wurden zunächst Polyplexe in einem N/P Verhältnis von 6 hergestellt. Danach pipettierte man die jeweilige Liposomendispersion in einem Masseverhältnis von 5:1 (μg Liposomen: μg pDNA) hinzu und inkubierte für 60 min.

Formulierung (molars Verhältnis)	Partikelgröße \pm SD [nm]	PDI	Zetapotential [mV]	Scoring
25kDa-bPEI	$76,3 \pm 3,4$	0,2	$+28,2 \pm 3,2$	+++
hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25)	$156,3 \pm 20,3$	0,3	$+38,3 \pm 5,2$	+++
MI-0907/DPPC/CH (20/55/25)	$144,5 \pm 15,4$	0,3	$+35,4 \pm 3,4$	+++
hGDNT/DPPC/CH (20/55/25)	$138,3 \pm 18,3$	0,3	$+15,3 \pm 3,4$	+++

4.3 Testung der pH-Stabilität

Um die pH-Stabilität von tetraetherlipidhaltigen Liposomen zu demonstrieren, wurden die Formulierungen hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol), MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) und hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) ausgewählt. Vor den Stabilitätsmessungen wurden die Formulierungen jeweils frisch hergestellt.

Die Testung der Liposomen erfolgte in folgenden Puffersysteme:

pH= 2,0 -> KCl/HCl-Puffer

pH= 4,0 -> Essigsäure/Acetat-Puffer

pH= 7,4 -> Tris/HCl-Puffer

pH= 9,0 -> Glycin/HCl-Puffer

Die Messung der Partikelgrößen und PDI-Werte nach Inkubation mit den Puffersystemen erfolgte nach verschiedenen Zeiten.

Tab. 13 pH-Stabilität der Liposomenformulierung hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol).

Messzeit	pH	Partikelgröße ± SD [nm]	PDI	Scoring
Sofort	2,0	191,2 ± 13,3	0,4	++
	4,0	168,5 ± 11,6	0,3	++
	7,4	152,0 ± 13,1	0,2	++
	9,0	143,8 ± 9,7	0,2	+++
Nach 2 h	2,0	178,7 ± 8,1	0,2	+++
	4,0	165,1 ± 11,7	0,3	++
	7,4	167,4 ± 12,1	0,3	++
	9,0	153,0 ± 9,6	0,3	++
Nach 18 h	2,0	181,0 ± 10,1	0,3	++
	4,0	146,2 ± 17,7	0,2	+++
	7,4	182,1 ± 31,3	0,4	+
	9,0	153,6 ± 15,5	0,3	+++

Tab. 14 pH-Stabilität von der Liposomenformulierung MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol).

Messzeit	pH	Partikelgröße ± SD [nm]	PDI	Scoring
Sofort	2,0	168,8 ± 10,5	0,3	+++
	4,0	144,6 ± 8,6	0,2	+
	7,4	145,1 ± 9,2	0,3	++
	9,0	147,0 ± 6,4	0,3	++
Nach 2 h	2,0	175,8 ± 8,8	0,3	+++
	4,0	161,3 ± 11,1	0,3	++
	7,4	144,9 ± 11,4	0,3	++
	9,0	154,7 ± 9,5	0,3	++
Nach 18 h	2,0	186,1 ± 13,4	0,3	++
	4,0	155,0 ± 15,3	0,2	+++
	7,4	163,0 ± 21,3	0,4	+
	9,0	156,6 ± 10,4	0,3	++

Tab. 15 pH-Stabilität der Liposomenformulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol).

Messzeit	pH	Partikelgröße \pm SD [nm]	PDI	Scoring
Sofort	2,0	144,8 \pm 15	0,3	++
	4,0	134,3 \pm 12	0,2	++
	7,4	135,7 \pm 16	0,3	++
	9,0	141,0 \pm 7	0,3	++
Nach 2 h	2,0	166,3 \pm 9	0,3	++
	4,0	158,3 \pm 11	0,3	++
	7,4	171,9 \pm 11	0,3	++
	9,0	151,7 \pm 9	0,3	++
Nach 18 h	2,0	183,1 \pm 14	0,3	++
	4,0	152,0 \pm 16	0,2	+
	7,4	183 \pm 16	0,4	+
	9,0	157,6 \pm 8	0,3	++

Tab. 16 pH-Stabilität von Lipoplexen

Lipoplexformulierung (molares Verhältnis)	pH	Partikelgröße \pm SD [nm]	PDI	Scoring
hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25)	2,0	391 \pm 23	0,3	+++
	4,0	238,9 \pm 7	0,2	+++
	7,4	421,9 \pm 42	0,4	+
	9,0	288,4 \pm 15	0,3	++
MI-0907/DPPC/CH (20/55/25)	2,0	310,6 \pm 24	0,4	++
	4,0	297,0 \pm 7	0,2	+++
	7,4	361,3 \pm 21	0,4	+
	9,0	280,9 \pm 11	0,2	+++

Alle drei Liposomenformulierungen behielten ihre Integrität über einen Zeitraum von 18 h in Medien verschiedener pH-Werte von 2 - 9. Geringe Veränderungen der Durchmesser fanden

über einen Zeitraum von 18 h statt. So beträgt der Durchmesser der Formulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) nach direkter Messung in einem pH-Wert von 2 $144,8 \pm 15$ nm. Nach 18 h Inkubationszeit ist er um 26 % auf $183,1 \pm 14$ nm angestiegen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in vorherigen Arbeiten veröffentlicht [61,62]. Die erhöhte Stabilität diente als Grundlage für die folgende Herstellung der Lipoplexe für den Gentransfer. Hierzu wurden die Liposomen bei einem N/P Verhältnis von 2,8 mit pDNA komplexiert und erneut einer Stabilitätstestung bei verschiedenen pH-Werten unterzogen. Die Messungen erfolgte 4 h nach Herstellung der Liposomen.

Alle Lipoplexformulierungen zeigten Durchmesser, die mit entsprechenden Literaturwerten übereinstimmten. Aufgrund der negativen Ladung der dritten Formulierung wurden keine Lipoplexe hergestellt. Diese Formulierung wird im späteren Verlauf zusammen mit den anderen Formulierungen für die Herstellung Lipopolyplexe verwendet.

4.4 Stabilität von Liposomen in Lungensurfaktant

Die drei zuvor hergestellten Liposomenformulierungen hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol), MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) und hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) wurden in verschiedenen Konzentration von Alveofact® für 30 min. inkubiert. Hierzu wurde Alveofact® in 150 mM NaCl auf die Konzentrationen 0,1 mg/ml und 2 mg/ml verdünnt.

Liposomengrößen und PDI Werte der getesteten Formulierungen sind bei Inkubation mit Alveofact® (0,1 mg/ml) leicht angestiegen, aber noch vergleichbar mit den Kontrollwerten. Man kann davon ausgehen, dass bei einer niedrigen Alveofact® Konzentration die Integrität der Liposomen nicht gestört wird. Dies ändert sich jedoch bei einer Alveofact® Konzentration von 2 mg/ml, bei der sowohl Liposomendurchmesser als auch PDI-Werte sprunghaft ansteigen.

Tab. 17 Stabilität der Liposomen in Alveofact®

Liposomenformulierung (molares Verhältnis)	Alveofact® Konzentration (mg/ml)	Partikelgröße ± SD [nm]	PDI	Scoring
hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25)	0 (Kontrolle)	142,2 ± 11,1	0,2	+++
	0,1	276,7 ± 23,4	0,4	+
	2,0	31200,1 ± 354,7	0,5	---
MI-0907/DPPC/CH (20/55/25)	0 (Kontrolle)	149,4 ± 9,2	0,2	+++
	0,1	162,9 ± 15,7	0,4	+
	2,0	6841,4 ± 589,3	1,0	----
hGDNT/DPPC/CH (20/55/25)	0 (Kontrolle)	132,2 ± 11,2	0,3	+++
	0,1	256,7 ± 23,2	0,5	+
	2,0	40200,2 ± 554,6	1,0	---

4.5 Interkalationsassay

Die zuvor getesteten Liposomenformulierungen hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol) und MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) erwiesen sich in den vorherigen Stabilitätsversuchen (pH-Stabilität) als vorteilhaft. Sie wurden für den Interkalationsassay in Form von Lipopolyplexen eingesetzt. Das Ausmaß der Komplexierung von den Formulierungen mit pDNA wird mit dem Interkalationsreagenz GelRed™ quantifiziert. Hierzu wurden Polyplexe, Lipoplexe und Lipopolyplexe mit einer 10000-fach verdünnten Lösung von GelRed™ in HEPES-Puffer inkubiert und die Fluoreszenz bei 600 nm mithilfe eines Mikroplatten-Lesegerätes bestimmt. Die Hintergrundfluoreszenz wurde von allen Werten subtrahiert.

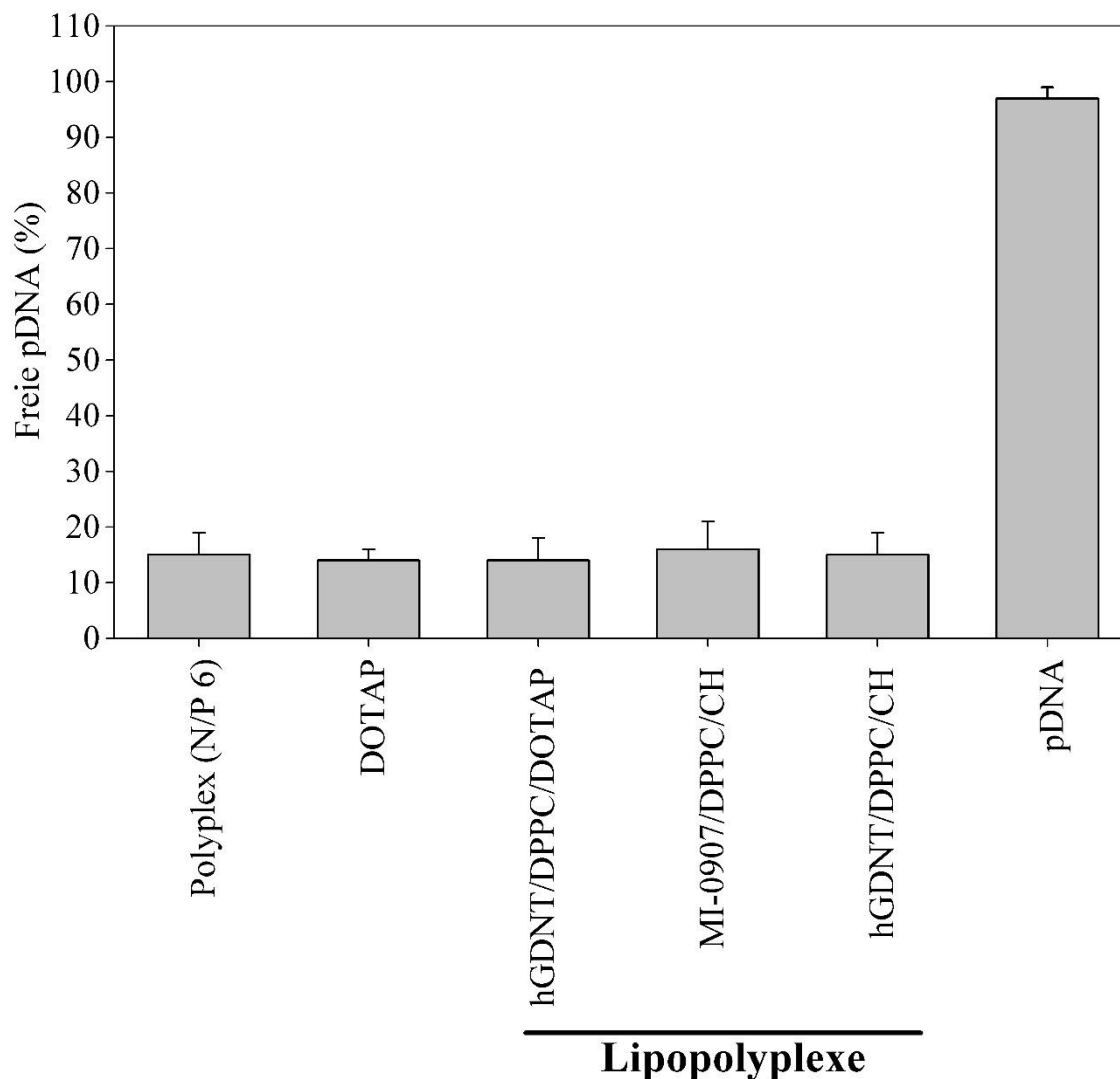


Abbildung 4.11 pDNA Immobilisierungs-Assay von Polyplexen und Lipoplexen und Lipopolyplexen. DNA-Komplexe mit Tetraetherlipiden (hGDNT oder MI-0907) wurden hergestellt und mit der DNA-Interkalierungssubstanz Gel-Red™ analysiert (10000-fache Verdünnung in HEPES). Der Gel-Red™ Interkalationsassay zeigte eine erfolgreiche Komplexierung. Sowohl bei Polyplexen als auch bei Lipopolyplexen sind 80-90 % der pDNA komplexiert [63]. Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die molaren Mengen der Lipide in der jeweiligen Formulierung. Das N/P-Verhältnis für DOTAP betrug 2,7. Die Lipopolyplexe enthielten Liposomen im Masseverhältnis von 5:1 (µg Liposomen: µg pDNA).

4.6 Transfektionsstudien mit Lipoplexen

Transfektionsstudien mit tetraetherlipidhaltigen Lipoplexen in SK-OV-3 Zellen zeigten insgesamt eine gute Transfektionseffizienz. Für die biphasige Liposomenformulierung (hGDNT/DOTAP 15/85 mol/mol/mol) ergab sich eine Transfektionseffizienz vergleichbar mit DOTAP. Eine Beimischung von Tetraetherlipiden wie in den Formulierungen

hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol) und MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) führte zu einer geringeren Transfektionseffizienz. Dies verdeutlicht den kompakteren Einschluss von pDNA durch Tetraetherlipide, was zu einem ineffizienten Release der pDNA innerhalb der Zelle führt.

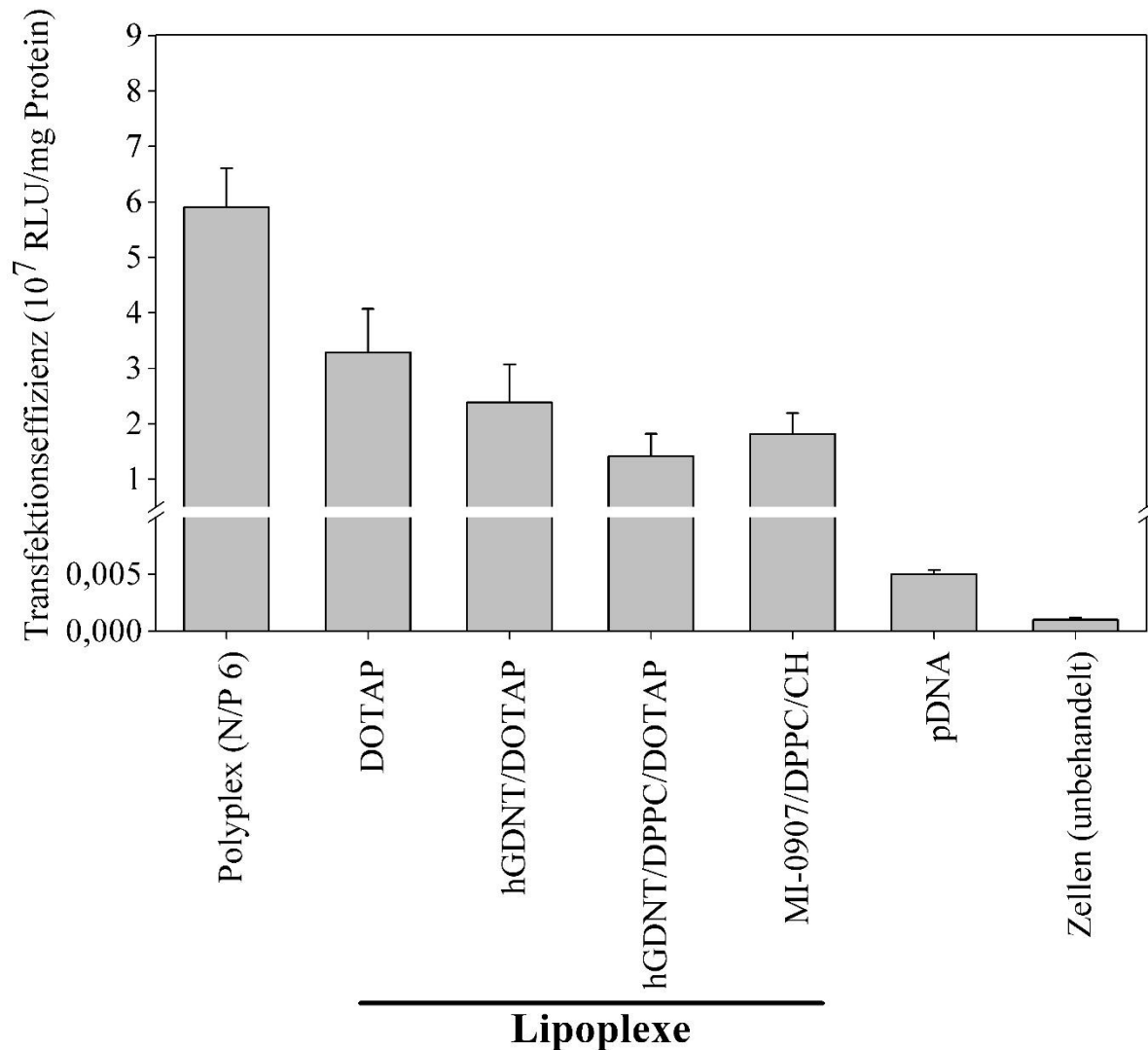


Abbildung 4.12 Transfektionseffizienz von verschiedenen Lipoplexen in SK-OV-3 Zellen. 25kDa-bPEI zeigte von allen getesteten Systemen die höchste Transfektionseffizienz, während DOTAP-Lipoplexe deutlich schlechter die Zellen transfizierten. Das Transfektionssystem hGDNT/DOTAP (15/85 mol/mol) zeigte eine verminderte Effizienz im Vergleich mit DOTAP. Die tetraetherlipidhaltigen Systeme schnitten bzgl. Transfektionseffizienz noch schlechter ab. Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die molaren Mengen der Lipide in der jeweiligen Formulierung. Das N/P-Verhältnis für DOTAP (100), hGDNT/DOTAP (15/85 mol/mol) und hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25) betrug 2,7. Das NP/Verhältnis für MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) betrug 3,0.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass tetraetherlipidhaltige Lipoplexe im Vergleich zu Goldstandards wie 25kDa-bPEI oder DOTAP eine niedrigere Transfektionseffizienz aufweisen. Dies liegt wahrscheinlich an der extrem festen Komplexierung von pDNA in Liposomen, was letztendlich zu einer geringeren Freisetzung der pDNA innerhalb der Zelle führt. Jedoch sollte man beachten, dass diese Formulierungen ihre strukturelle Integrität in säurehaltigen Lösungen beibehalten können und somit prädestiniert für die orale Gentherapie sind.

4.7 Transfektionsstudien mit Lipopolyplexen

Um nun die Transfektionseffizienz der tetraetherlipidhaltigen liposomalen Systeme zu erhöhen, werden die Formulierungen in den nachfolgenden Experimenten mit Polyplexen, bestehend aus 25kDa-bPEI, kombiniert. Daraus resultieren Transfektionsvehikel, bei denen der Polyplex mit einer tetraetherlipidhaltigen Lipiddoppelmembran ummantelt wird, sogenannten Lipopolyplexe. Für dieses Experiment wurden erstmal Polyplexe und pDNA in einem N/P-Verhältnis von 6 hergestellt. Nach anschließender Inkubation von 20 min pipettierte man die vorgefertigten Liposomen zu den Polyplexen und inkubierte für einen weiteren Zeitraum von 60 min (Abbildung 3.6). Lipopolyplexe wurden in einem Masseverhältnis von 5:1 (μg Liposomen: μg pDNA) hergestellt. Die Formulierungen DOTAP und hGDNT/DOTAP (15/85 mol/mol) wurde für die nachfolgenden Experimente aufgrund der hohen positiven Ladung ausgeschlossen. Die Fokussierung lag stattdessen auf tetraetherlipidhaltigen Liposomen, die in den vorherigen Experimenten eine gute Säurestabilität zeigten.

Die Transfektionseffizienzen von Lipopolyplexen bestehend aus hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol), MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) und hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) lagen insgesamt deutlich über den Effizienzen von den einfachen Liposomenformulierungen (Abbildung 4.13). Besonders stark erhöhte sich die Effizienz der letztgenannten Formulierung, was auf eine besonders effektive Genexpression schließen lässt.

Die Lumineszenzeinheiten (RLU) relativierte man auf den Gesamtproteingehalt, welcher mit dem BCA-Assay ermittelt wurde. Reine pDNA und unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrollen.

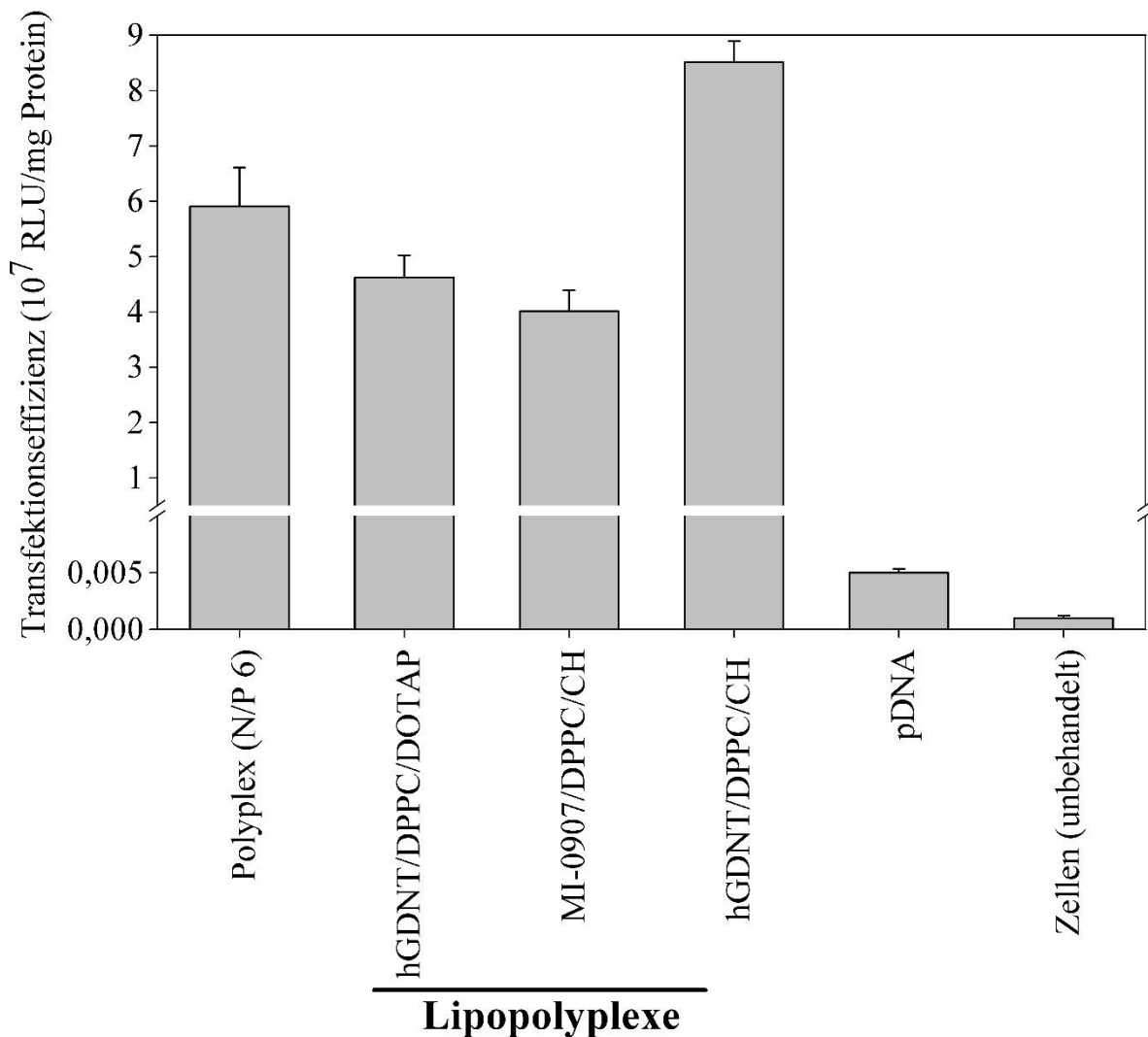


Abbildung 4.13 Transfektionseffizienz von verschiedenen Lipopolyplexen in SK-OV-3 Zellen. Die zuvor charakterisierten Lipopolyplexe zeigten im Vergleich zu Lipoplexen eine deutlich höhere Transfektionseffizienz. Die beide positiv geladenen Formulierungen hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25) und MI-0907/DPPC/CH (20/55/25) führten zu einer um ca. 15 % bzw. 20 % reduzierten Transfektionseffizienz im Vergleich zur Referenzsubstanz 25kDa-bPEI. Die Formulierung hGDNT/DPPC/CH (25/55/20), mit einer leicht negativen Gesamtladung, erhöhte die Transfektionseffizienz um ca. 50 % im Vergleich zu reinem 25kDa-bPEI. Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die molaren Mengen der Lipide in der jeweiligen Formulierung. Die Lipopolyplexe enthielten Liposomen im Masseverhältnis von 5:1 (μg Liposomen: μg pDNA).

4.8 Toxizitätsstudien

Die Toxizitäten der einzelnen Transfektionssysteme wurden mit dem MTT-Assay ermittelt (Kapitel 3.14 und 3.15). Die deutliche erhöhte Toxizität von 25kDa-bPEI ist allgemein bekannt und wurde bereits in der Vergangenheit mehrfach publiziert [66, 67]. Die Ummantelung von Polyplexen mit einer Lipidmembran (Lipopolyplexe) führt zu einer herabgesetzten Toxizität

und stellt Transfektionssysteme dar, die auch aufgrund ihrer höheren Transfektionseffizienz in Zukunft eine wichtige Rolle spielen werden.

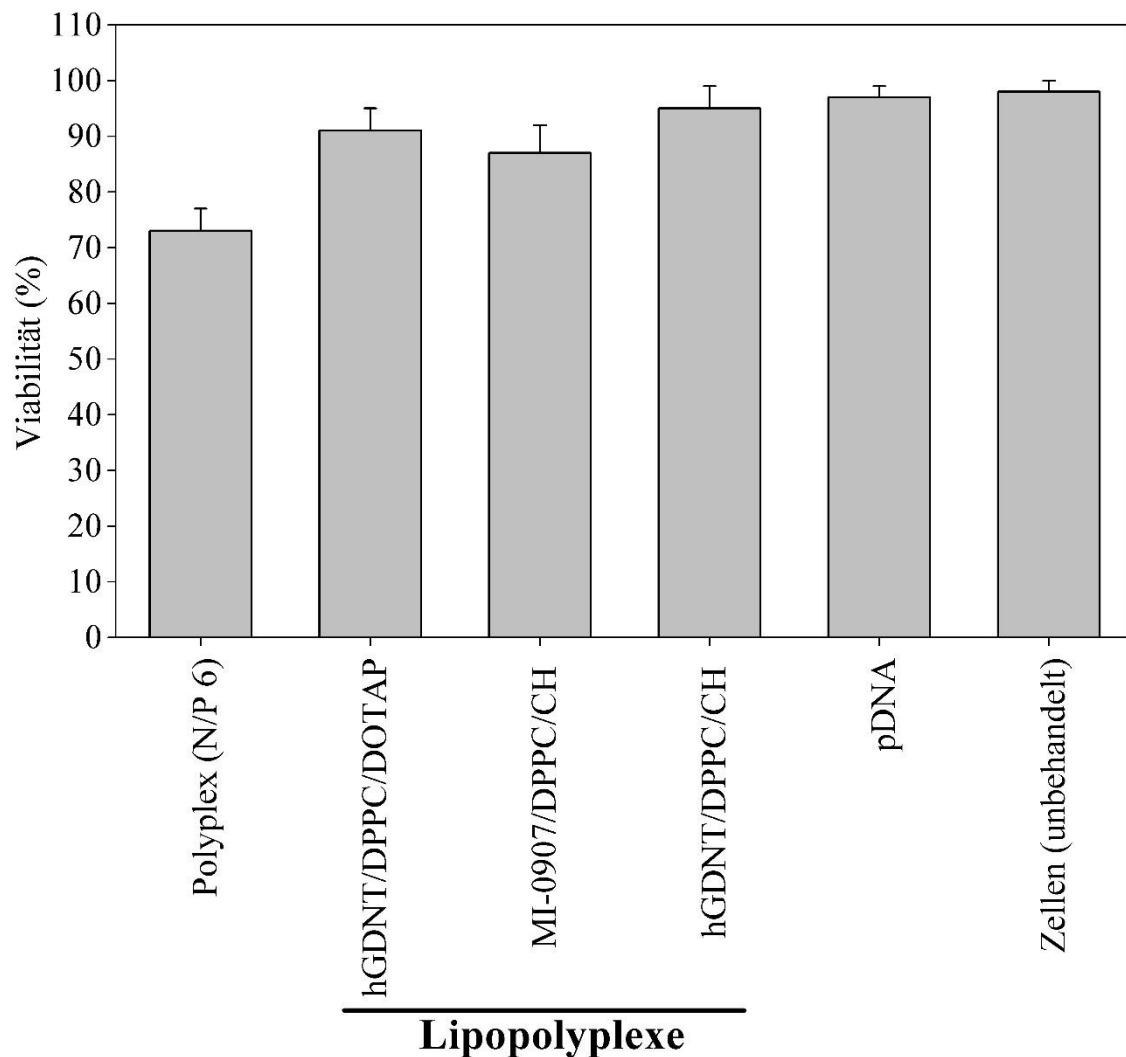


Abbildung 4.14 MTT-Assay von Polyplexen und Lipopolyplexen in SK-OV-3. Zellen.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde u.a. der MTT Assay herangezogen. als unbehandelte Zellen als Negativkontrolle. Die Toxizität von der Polyplexen, bestehend aus 25kDa-bPEI ist im Vergleich zu Lipopolyplexen deutlich erhöht. Innerhalb der Lipopolyplexe lässt sich feststellen, dass die positiv geladenen Formulierungen hGDNT/DPPC/DOTAP (25/55/20) und MI-0907/DPPC/CH (25/55/20) wesentlich toxischer sind als die Formulierung hGDNT/DPPC/CH (25/55/20). Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die molaren Mengen der Lipide in der jeweiligen Formulierung. Die Lipopolyplexe enthielten Liposomen im Masseverhältnis von 5:1 (μg Liposomen: μg pDNA).

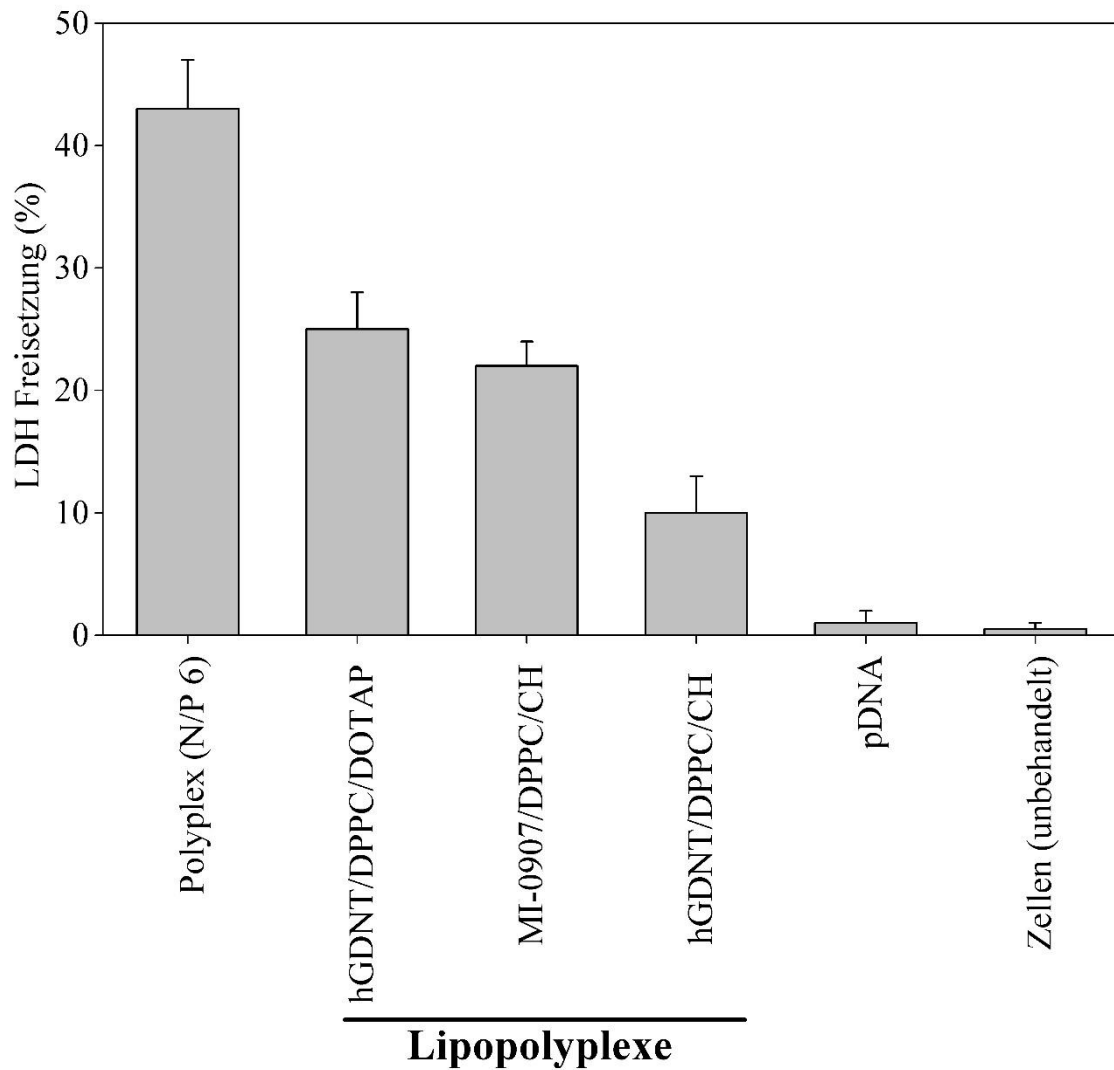


Abbildung 4.15 LDHAssay von Polyplexen und Lipopolyplexen in SK-OV-3 Zellen.

Die höchste Freisetzung von LDH betrug 40 % und zeigt die allgemein bekannte Toxizität von 25kDa-bPEI. Lipopolyplexe zeigten eine deutlich geringere Freisetzung von LDH, was eine höhere Viabilität der Zellen bedeutet. Innerhalb der Lipopolyplexe zeigte die Formulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25) die niedrigste Toxizität. Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die molaren Mengen der Lipide in der jeweiligen Formulierung. Die Lipopolyplexe enthielten Liposomen im Masseverhältnis von 5:1 (μg Liposomen: μg pDNA).

4.9 Heparin-Assay

Zur Stabilitätsmessung der tetraetherlipidhaltigen Lipopolyplexe wurde ein Heparinassay durchgeführt. Hierzu inkubierte man die Formulierungen 15 min mit aufsteigenden Konzentrationen von Heparin, um die Integrität der Lipopolyplexe zu bestimmen. Dies gibt einen Hinweis, wie stark pDNA innerhalb der Formulierung gelagert ist. Die Stabilität von einfachen Polyplexen und tetraetherlipidhaltigen Lipopolyplexen unterscheidet sich stark voneinander. Während komplexierte pDNA bei Polyplexen bereits ab einer Konzentration von 15 IU Heparin freigesetzt wird, können Lipopolyplexe pDNA bis zu einer Heparinkonzentration von 30 IU zurückhalten [63]. Dies verdeutlicht den stabilitätsgebenden Einfluss der Tetraetherlipide innerhalb der Formulierungen (Abbildung 4.16).

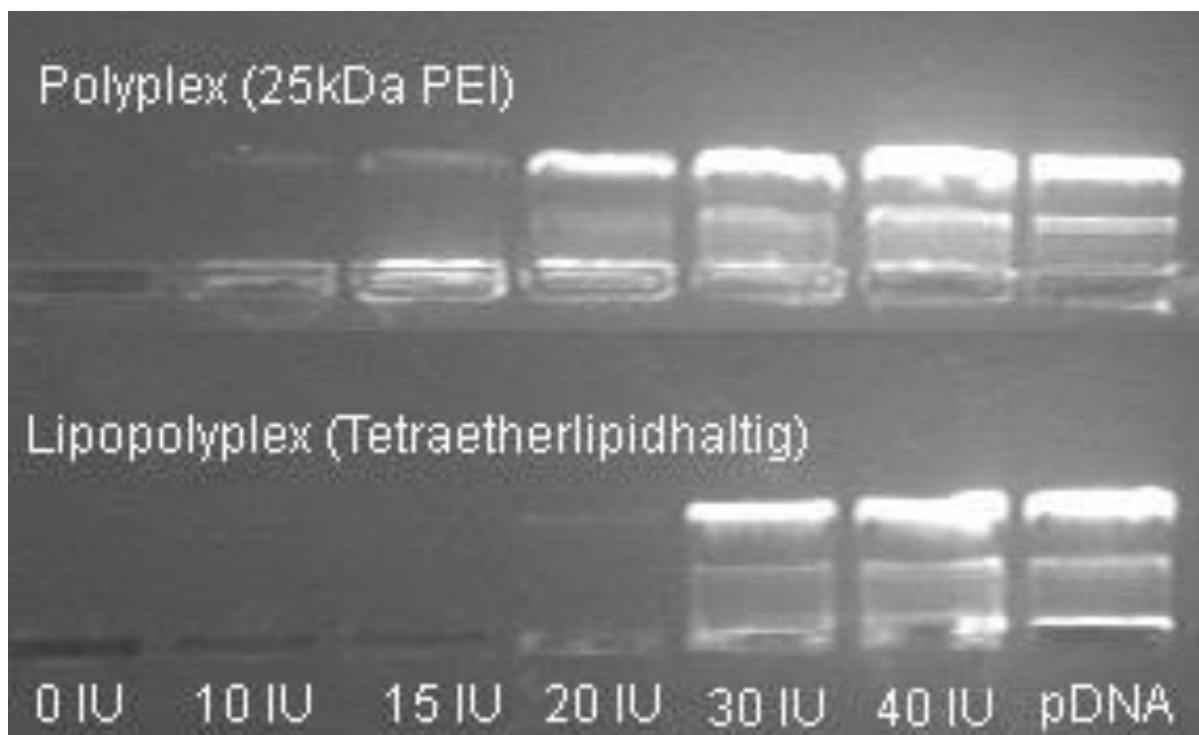


Abbildung 4.16 Heparin-Assay von Polyplexen und Lipopolyplexen.

Die Herstellung der Polyplexe erfolgte durch Inkubation von pDNA mit 25kDa-bPEI bei einem N/P Verhältnis von 6. Die Herstellung der Lipopolyplexe erfolgt durch Hinzufügen von tetraetherlipidhaltigen Liposomen in einer Konzentration von 5/1 (μg Liposomen/ μg pDNA). Nach einer Inkubation von 20 min, pipettierte man steigende Konzentrationen von Heparin hinzu (0 IU - 40 IU) und inkubierte weiterhin für 15 min. 40 μl der einzelnen Proben wurde in die Taschen eines Agarose-Gel pipettiert, eine Spannung von +80 V angelegt und die Gelelektrophorese 1h laufen gelassen.

4.10 Morphologische Aspekte

4.10.1 Rasterkraftmikroskopie

Polyplexe, also komplexe Strukturen aus 25kDa-bPEI und pDNA (N/P 6), zeigten bei Vermessung mittels Rasterkraftmikroskop, kugelartige Strukturen. Die Durchmesser der Partikel lagen in dem Bereich von 60 - 80 nm und waren im Einklang mit DLS Messungen (Abbildung 4.17). Die Darstellung erfolgte nach 15 minütiger Inkubation der Probe auf dem Silikonwafer.

Morphologische Charakterisierung von tetraetherlipidhaltigen Liposomen mittels Rasterkraftmikroskopie zeigte eine rundliche Form der Vesikel. Die Durchmesser betrugen zwischen 100 nm und 200 nm und korrelierten gut mit DLS Messungen. Es wurden jedoch auch Liposomen mit unregelmäßiger Form gefunden. Dies lässt sich auf eine Spreitung der Liposomen auf dem Silikonwafer zurückführen. (Abbildung 4.18). Die Darstellung der Lipid-pDNA Komplexe mithilfe der Rasterkraftmikroskopie zeigte komplexe Strukturen, wie z.B. zwiebelartige Strukturen (Abbildung 4.20), wobei sich die Liposomen um pDNA winden. Ebenso kommt es zu lipidumhüllter pDNA, die aus dem Komplex herausragt.

Die Darstellung von Lipopolyplexen zeigte vollständig und unvollständige Ummantelung des „Polyplexxkerns“ mit einer Lipiddoppelschicht. Da die Messung der Lipopolyplexe im trockenen Zustand durchgeführt wurde, ist es wahrscheinlich, dass die „aufgebrochene“ Lipidhülle nur durch die Präparationsmethode zustande kam. Hierbei ergibt sich die Möglichkeit, die Höhe der Lipiddoppelmembran zu bestimmen. Diese kommt vor allem im Phasenbild (Abbildung 4.22, weißer Pfeil) als ein schwarzer Ring um den Polyplexxkern zum Vorschein. Die Messung der Höhe ergab einen Wert von 4,12 nm, was genau der Höhe einer Lipiddoppelmembran entspricht.

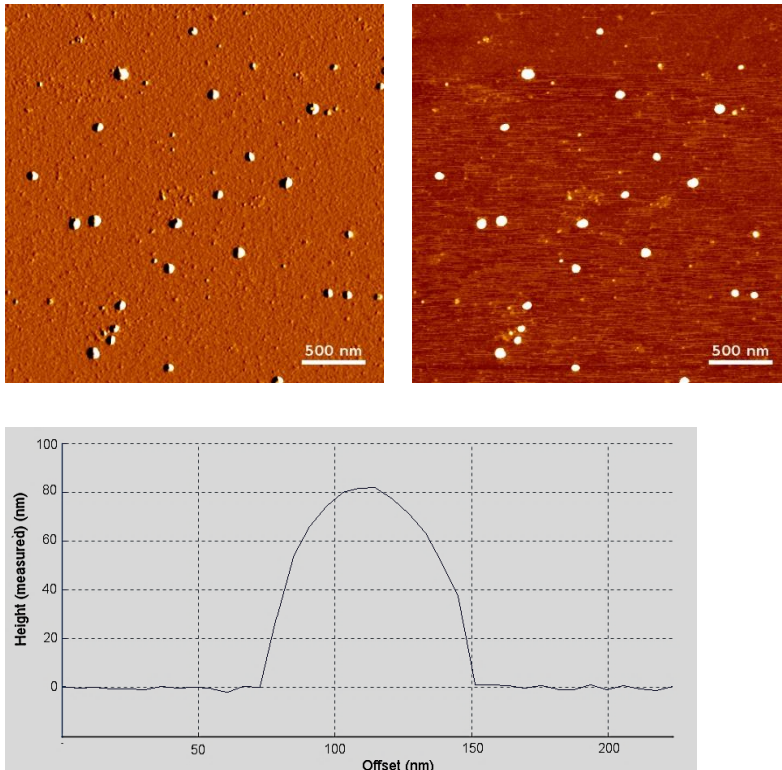


Abbildung 4.17 Darstellung von Polyplexen (25kDa-bPEI, N/P 6) mit dem Rasterkraftmikroskop. Das Amplitudenbild (links) stellt vereinzelte Partikel dar. Sie haben im Höhenbild (rechts) eine helle weiße Färbung, damit der Größenunterschied deutlicher ausfällt. Die Aufnahmen zeigen Polyplexe in einem Größenbereich von 60 - 80 nm (unten). Die Messung der Partikel erfolgte nach einer 15-minütigen Inkubation auf einem Silikonwafer mithilfe des „intermittent contact“-Modus.

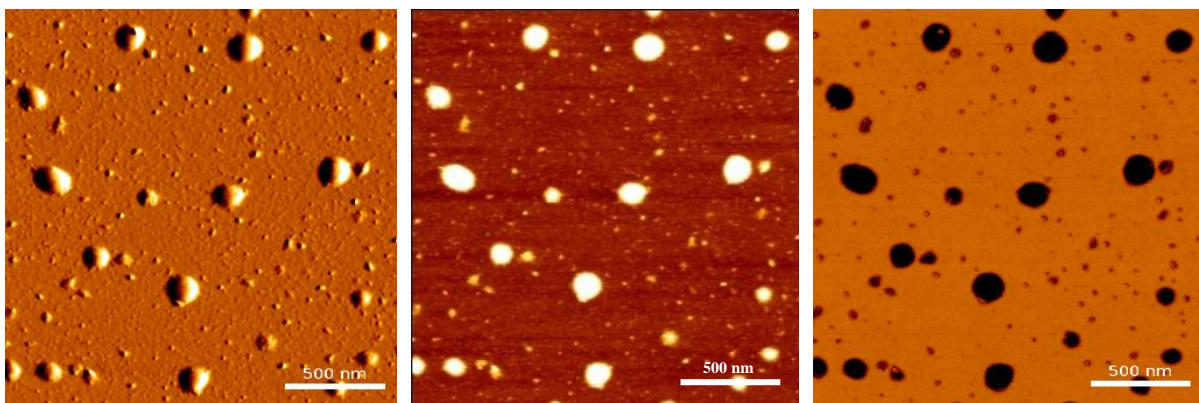


Abbildung 4.18 Darstellung von Liposomen mit dem Rasterkraftmikroskop. Liposomen im Größenbereich von 100 - 200 nm konnten gut dargestellt werden und zeigten weitgehend runde Formen (links). Die Aufnahmen erfolgten nach einer 15-minütigen Inkubation der Liposomendispersion auf einem Silikonwafer mithilfe des „intermittent-contact“-Modus. Mitte: Höhenbild. Rechts: Phasenbild.

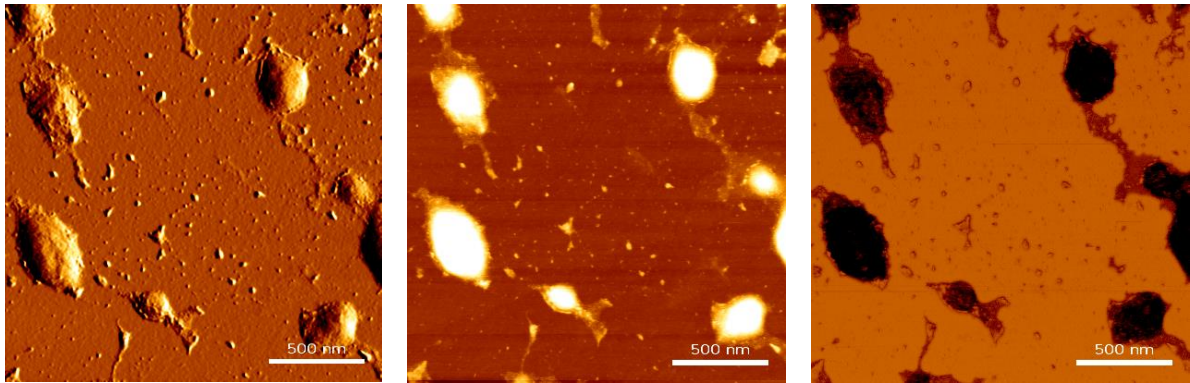


Abbildung 4.19 Darstellung von DOTAP-Lipoplexen (N/P 2,7) mit dem Rasterkraftmikroskop. Die dargestellten Lipoplexe zeigen einen Größenbereich von 200 nm bis 400 nm (links). Die Komplexierung der Liposomen mit pDNA ist besonders deutlich im Phasenbild (rechts) zu erkennen. Während die schwarzen Strukturen DOTAP Liposomen darstellen, ist komplexierte pDNA als hellere Bereiche um die Liposomen erkennbar. Ebenso lässt sich im Phasenbild erkennen, dass die einzelnen Lipoplexe über pDNA miteinander verbunden sind und „perlenartige“ Strukturen bilden. Teilweise liegt pDNA auch frei vor. Die Aufnahmen erfolgten nach einer 15-minütigen Inkubation der Liposomdispersion auf einem Silikonwafer mithilfe des „intermittent-contact“ Modus.

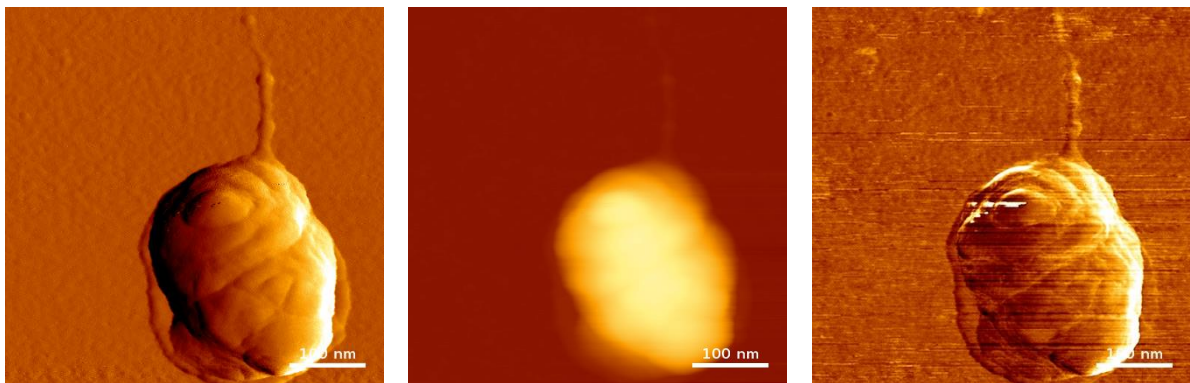


Abbildung 4.20 Detaillierte Darstellung eines DOTAP-Lipoplexes mit dem Rasterkraftmikroskop. Der dargestellte Lipoplex zeigt eine Größe 352 nm. Man erkennt deutlich die „zwiebelartige“ Struktur des Komplexes im Amplitudenbild (links). Die multilamellare Struktur ist auch im Phasenbild erkennbar. Der fadenförmige Ausläufer (Breite ca. 13 nm) stellt lipidummantelte pDNA dar. Die Aufnahmen erfolgten nach einer 15-minütigen Inkubation der Lipoplexdispersion auf einem Silikonwafer mithilfe des „intermittent-contact“ Modus.

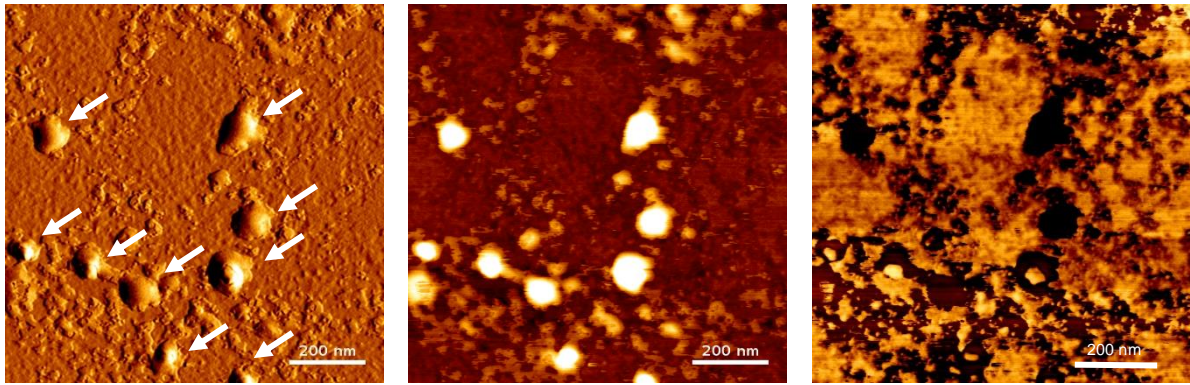


Abbildung 4.21 Darstellung von Lipopolyplexen mit dem Rasterkraftmikroskop.

Die Herstellung der Lipopolyplexen erfolgte aus der Inkubation von Polyplexen (25kDa-bPEI, N/P 6) und Liposomen (hier am Beispiel von hGNT/DPPC/CH (25/55/20 mol/mol/mol). Die Inkubationszeit betrug 60 min. Danach wurde die Lipopolyplexdispersion auf einem gereinigten Silikonwafer für weitere 15 min inkubiert. Nach anschließender Trocknung erfolgte die Messung mit Hilfe des „intermittent-contact“-Modus. Es wurden neben vollständigen Lipopolyplexen auch „aufgerissene“ Lipopolyplexe gefunden, d.h. die Lipidschicht war nicht mehr vollständig intakt. Dies konnte man im Phasenbild (rechts) deutlich erkennen. Hier ist ein dünner schwarzer Ring am Lipopolyplex vorhanden.

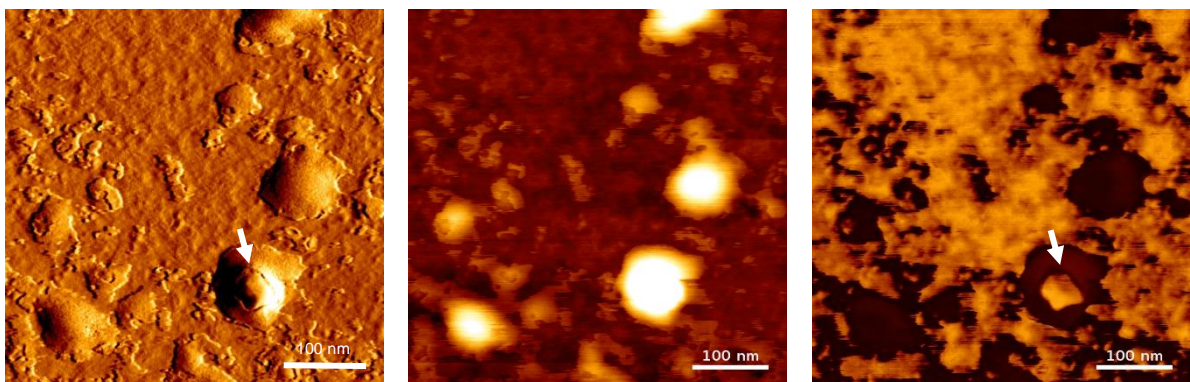


Abbildung 4.22 Detaillierte Darstellung eines Lipopolyplexes mit dem Rasterkraftmikroskop.

Neben vollständig lipidumhüllten Lipopolyplexen sind auch Lipopolyplexe erkennbar, bei denen die Lipidschicht „aufgebrochen“ ist (linkes und rechtes Bild, weißer Pfeil). Dies ermöglicht die Messung der Dicke der Lipidschicht, die im vorliegenden Beispiel 4,12 nm beträgt (leichte schwarze Umrandung im rechten Bild). Amplitudenbild. Mitte: Höhenbild. Rechts: Phasenbild.

4.10.2 Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM)

Liposomen waren als sphärische Strukturen zu sehen, die jedoch keine Bruchkante zeigten. Dies ist typisch für tetraetherlipidhaltige Liposomen. Die Liposomen waren alle vollständig geschlossen und unversehrt. Es wurden keine Bruchkerben gefunden, wie es bei gewöhnlichen Liposomen, ohne Tetraetherlipide, üblich ist [64].

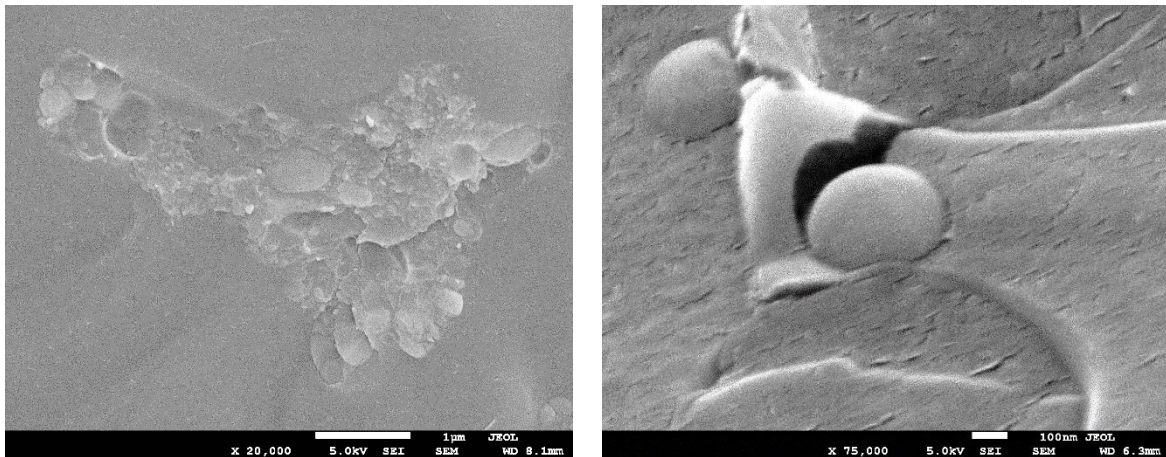


Abbildung 4.23 Darstellung von tetraetherlipidhaltigen Liposomen mit Kryo-REM.

10 µl der Liposomendispersion pipettierte man auf einen Probehalter, der anschließend in flüssigen Stickstoff getaucht wurde. Die Probe kam nach Einfrierung in eine Vorbereitungskammer des „JEOL JSM-7500F“, wo man dann mithilfe einer feinen Klinge eine Bruchkerbe herbeiführte. Anschließend wurde die Probe mit Gold besputtert, um so die Leitfähigkeit zu erhöhen. Das Instrument wurde während der gesamten Messung auf -170 °C gekühlt.

4.10.3 Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM)

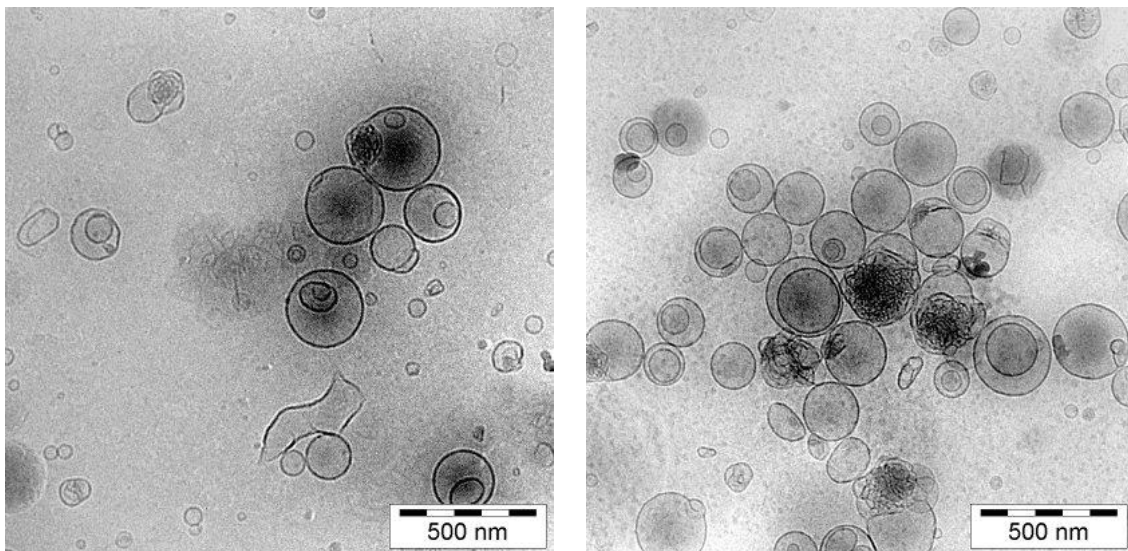


Abbildung 4.24 Darstellung von tetraetherlipidhaltigen Liposomen mit Kryo-TEM.

Bis zur Messung lagerten die Proben im Kühlschrank bei +4 °C. Die lyophilisierte Probe wurde mit 0,5 ml Puffer hydratisiert und für mind. 30 min. bei RT inkubiert. Ein kleiner Tropfen (ca. 3 µl) der Liposomenprobe pipettierte man auf ein mit Lochfolie befilmtes und mit Kohle bedampftes 400 x100 mesh Kupfernetz (Grid). Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit mit Filterpapier erfolgte die sofortige Einführung des Grids in flüssiges Ethan (Kryogen, 90 K) zur Schockgefrierung. Die Einführung der Präparate in das in das TEM (120keV) gelang mit Hilfe einer Kryo-Transfervorrichtung.

5 Diskussion

Nach dem aktuellen Wissenstand ist dies die erste Studie, die sich mit Stabilitäten, Zelltoxizitäten und Transfektionseffizienzen von isolierten nativen und halbsynthetischen Tetraetherlipiden von *Sulfolobus acidocaldarius* beschäftigt. Eine Vollsynthese von Tetraetherlipiden wurde bereits erfolgreich durchgeführt [120-122]. Jedoch weisen diese Verfahren einen erhöhten Kosten- und Personalaufwand auf. Ebenso sind wichtige Merkmalsstrukturen der Tetraetherlipide wie z.B. der Ringschluss im C-40-Rückgrat nur mit viel Aufwand synthetisierbar [123]. Somit bieten isolierte und aufgereinigte bzw. halbsynthetische Tetraetherlipide eine bessere Alternative.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein standardisierter und reproduzierbarer Extraktionsprozess für vier verschiedene Tetraetherlipidfraktionen (TEL, PLFE, hDGNT und hGDGT) erfolgreich etabliert. Mithilfe einer Soxhlet Apparatur und des universellen Extraktionsmittels $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (50/50 v/v) konnte eine Lipidfraktion so extrahiert werden, dass die Zuckergruppen als auch die Phosphatgruppen intakt blieben (Abbildung 1.18, PLFE und TEL). Die direkt nach der Soxhlet-Extraktion erhaltene Lipidfraktion „TEL“ stellt somit ein relativ unreines Produkt dar [124]. Neben einer erhöhten Anzahl an Spots auf der HPTLC Platte (Abbildung 4.1, rechts) weist es auch eine fast schwarze Färbung auf (Abbildung 4.1). Die diversen Spots lassen auf eine Vielzahl von Verunreinigungen, wie z.B. Squalene oder Pigmente schließen, die zusammen mit dem organischen Lösungsmittel extrahiert wurden [125]. Eine nachfolgende Aufreinigung an einer selbstgefüllten Chromabond C-18 Säule konnte die polare Lipidfraktion E (PLFE) mit der mobilen Phase $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (22,5/55/22,5 v/v/v) erfolgreich eluieren [126]. Die Analytik mithilfe von Dünnschichtchromatographie zeigte einen R_f -Wert von 0,2 der mit den Ergebnissen von Lo *et al.* [116] übereinstimmte und die erhöhte Polarität der anwesenden Zuckergruppe widerspiegelt. Im Gegensatz zu Lo *et al.* war jedoch keine weitere Aufreinigung mittels Methanolfällung notwendig, da das Endprodukt relativ rein war (Abbildung 4.2, rechts). Die Zuckergruppen von PLFE konnten durch eine Säurebehandlung mit 4 M HCl und der daraus resultierenden Esterspaltung an der Phosphorsäureestergruppe leicht entfernt werden [127]. Die hydrolysierten Tetraetherlipide hGDNT und hGDGT (Abbildung 1.18) wurden somit gewonnen. Im Vergleich zu Bode *et al.* [116] war diese Prozedur bzgl. der Qualität von hGDNT erfolgreicher. Bei der Untersuchung dieser Lipide mittels DC konnte man bei Benutzung der mobilen Phase von $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90/10 v/v) feststellen, dass die hydrolysierten Lipide eine

wesentlich geringere Polarität als PLFE hatten. Der Rf-Wert für hGDNT lag bei 0,3, der auch dem Standard des hGDNTs der Firma Surface and Interface Technologies entsprach (Abbildung 4.2 rechts). Reinste Formen der Tetraetherlipide haben aufgrund der Abwesenheit von farbgebenden π -Elektronensystemen keine Färbung. Jedoch sind in der vorliegenden Arbeit deutliche Färbungen der Endprodukte von fast schwarz (TEL) (Abbildung 4.1, links) über rötlich (PLFE) (Abbildung 4.2, links) bis hin zu orange/gelblich (hGDNT und hGDGT) zu sehen. Sie werden durch intensive Farbpigmente hervorgerufen, die mit den genutzten Aufreinigungsverfahren schwer zu entfernen sind. Hierzu bedarf es den Einsatz von instrumentellen analytischen Verfahren wie der präparative HPLC [128]. Neben den erwähnten nativen Tetraetherlipiden stellen halbsynthetische Tetraetherlipide eine interessante Variante dar. Hier lassen sich die besonderen Eigenschaften der Lipide wie z.B. Säurestabilität und mit weiteren Eigenschaften wie z.B. einer positiven Ladung ergänzen. Die Ausgangsverbindung, eine Dicaldarchaeol-Dicarbonsäure (Abbildung 3.4) bietet aufgrund der beiden Carbonsäuregruppen eine leichte „Angriffsfläche“ für eine Aminogruppe die an dem Molekül 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-piperazin vorhanden ist. Die so entstehenden Peptidbindungen an beiden Seiten der Grundstruktur sorgen für eine positive Ladung am Lipid (als MI-0907 benannt). Ähnliche Produkte wurden bereits von Balakireva *et. al* erfolgreich synthetisiert und zur Gentransfektion eingesetzt [129]. Neben der einfachen Analytik der Lipide auf einer HPTLC Platte eignen sich vor allem instrumentelle Verfahren wie ESI-MS, UV-VIS und NMR.

Bei den aufgereinigten hydrolysierten Lipidfraktionen (hGDNT und hGDGT) sowie bei MI-0907 waren der Molmasse entsprechende Molpeaks nur schwach ausgeprägt oder fehlten komplett (Abbildungen 4.6, 4.9 und 4.10). Dies ist zurückzuführen auf die erhöhte Anzahl an Protonen innerhalb des Moleküls. Hierdurch wird eine Vielzahl an Fragmenten produziert, die letztendlich dazu führen, dass das vollständige Molekül, also das $[M+Na]^+$ -Ion mit einer relativ geringen Intensität dargestellt wird [130,131]. Eine Streuung von Signalen um den Molpeak lässt sich vor allem bei hGDNT und hGDGT (Abbildung 4.6 und 4.9) gut erkennen. Die zusätzlichen Peaks, sind Hinweise auf die vorhandenen Zyklopentanringe innerhalb der Struktur des Lipids [132]. Bei der Untersuchung von hGDNT mit ESI-MS konnte klar das Natriumaddukt detektiert werden. Dies lag 23 g/mol über der theoretischen Masse von hGDNT (1456 g/mol). Das 1H -NMR und IR-Spektrum von hGDNT zeigten relevante Peaks und Banden für hGDNT, vergleichbar mit der Arbeit von Parmentier *et al.* [116].

Tetraetherlipidhaltige Liposomen ließen sich in Abhängigkeit von der molaren Masse des Lipids und der Lipidfraktion nach der Filmbildungsmethode herstellen. Da sich Liposomen erst bei einem bestimmten Packungsparameter des Lipids bilden, stehen hier vor allem PLFE als auch hGDNT (jeweils mit großen Kopfgruppen) im Vordergrund [133]. Zusätzlich ist eine neutrale oder positive Ladung von Vorteil, da positive geladene Liposomen verstärkt mit negativ geladener pDNA komplexieren können. Somit stellen die liposomalen Formulierungen hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol) und MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) geeignete Liposomen zur Herstellung von Genvektoren dar. Beide Formulierungen zeigten Durchmesser von $147,8 \pm 13,5$ nm bzw. $150,5 \pm 11,9$ nm und hatten eine positive Ladung. Die dritte ausgewählte Formulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) war mit einer leichten negativen Ladung ausgestattet. Hohe PDI-Werte und Liposomendurchmesser, die bei manchen Formulierungen beobachtet wurden, deuten auf eine Fusion/Aggregation der Vesikel hin. Ebenso ist es möglich, dass es zu einer Phasenseparation der Komponenten gekommen ist. Es könnte auch sein, dass eine Formierung von kleineren Liposomen nicht möglich ist.

Die hervorragende Stabilität der einzelnen Formulierungen in verschiedenen pH-Werten von 2 - 9 verdeutlicht den Effekt der Tetraetherlipide. Während konventionelle Liposomen (z.B. bestehend aus Phospholipon) bei Inkubation in Medien mit pH-Werten von 2, bis auf das 4-fache ihrer Ausgangsgröße anschwellen [134] blieben die Durchmesser von tetraetherlipidhaltigen Liposomen relativ konstant [Tab. 13-15]. Der Grund für das Anschwellen der Liposomen beruht auf der Tatsache, dass es zu einem Kompensationsmechanismus kommt, der das Ungleichgewicht zwischen Liposomen und äußerem Milieu behebt [135, 136]. Die Testung von entsprechenden Lipoplexen brachte ähnliche Ergebnisse. Auch hier blieben die getesteten Formulierungen bzgl. ihrer Größe und Polydispersitätsindex relativ konstant (Tab 16). Eine orale Applikation von kationischen tetraetherlipidhaltigen Liposomen, in denen das Peptid Octreotid verkapselt wurde, zeigte bereits Erfolge in Tierversuchen [137]. Jensen *et al.* [138] inkubierten tetraetherlipidhaltige Liposomen in Gallensalzen und konnten zeigen, dass die Liposomen ihre Integrität nicht verlieren. Die Testung der ausgewählten Formulierungen in Alveofact® zerstörte bei höheren Konzentration von 2 mg/ml die Integrität der Liposomen (Tab 17), wohingegen bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml kein Einfluss bemerkbar war. Ein Anstieg der Partikelgröße um den Faktor 113 bei der Formulierung hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol) lässt darauf schließen, dass es zu einer Aggregation von Liposomen oder zur Ausbildung von

mehreren Populationen gekommen ist. Surfactant als sogenannte „grenzflächenaktive Substanz“ (Tensid) setzt hierbei die Oberflächenspannung herab, was letztendlich zur Desintegration der Liposomen führt [139, 140].

Mithilfe eines Gel-Red™ Assays wurden die bereits erwähnten Formulierungen als Lipopolyplexe auf ihre Komplexierungsneigung mit pDNA überprüft (Abbildung 4.11.). Alle Formulierungen komplexierten pDNA bis zu 90%. Dies liegt vor allem an der starken positiven Ladungsdichte im Polymer (25kDa-bPEI) und ist bedingt durch die hohe Anzahl an protonierbaren Stickstoffatomen.

Bei den Transfektionsstudien zeigten tetraetherlipidhaltige Lipoplexe eine um 30 - 40 % geringere Transfektionseffizienz im Vergleich zu DOTAP oder 25kDa-bPEI (Abbildung 4.12). Grund hierfür ist der kompaktere Einschluss von pDNA innerhalb des Lipoplexes, was zu einer Zurückhaltung der pDNA führt und sie somit für die weitere Prozessierung innerhalb der Zelle nicht zur Verfügung steht. Ähnliches wurde bei Einschluss des Photosensitizers „chlorin e6“ in tetraetherlipidhaltige Liposomen beobachtet. Hier zeigte sich eine verzögerte und verminderte Freisetzung des Moleküls [141].

Des Weiteren ist die positive Ladungsdichte, die Molarität von DOTAP, eher gering, was letztendlich ebenfalls zu einer geringeren Transfektionseffizienz führt. Eine reziproke Beziehung zwischen positiver Ladungsdichte und Transfektionseffizienz wurde beschrieben [142]. Trotzdem reduziert ein geringerer molarer Anteil an DOTAP potentielle Oxidationen an beiden ungesättigten Fettsäuren des Moleküls (Abbildung 1.9) und dient somit dem Ziel der Arbeit eine oral verfügbare Gentherapie zu entwickeln.

Die Transfektionseffizienz konnte bei Benutzung von Lipopolyplexen deutlich erhöht werden [143, 144] (Abbildung 4.13). Die Formulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) erreichte sogar eine 50 % höhere Effizienz als die Goldstandards 25kDa-bPEI oder DOTAP. Bei Lipopolyplexen wird der Polyplexxern mit liposomalen Formulierungen ummantelt. Aufgrund der positiven Ladung der Lipopolyplexe kommt es zur effizienten Annäherung an negativ geladene Oberflächenproteine, gefolgt von der endosomalen Einfuhr in die Zelle. Der „Protonenschwammeeffekt“ des verzweigte Polyethylenimins sorgt zusätzlich für die hohe Gentransfektion. Ebenso erhöht der Zusatz von Cholesterol in der Formulierung die Fluidität des Lipopolyplexes.

Da sowohl lineare als auch verzweigte Polymere eine erhöhte zelluläre Toxizität besitzen [145, 146], kann diese durch die Herstellung von Lipopolyplexen deutlich erniedrigt werden (Abbildung 4.14 und 4.15). Eine 4-fach reduzierte Toxizität im Vergleich zu 25kDa-bPEI konnte bei der Formulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol) beobachtet werden. Die Abschirmung des toxischen Polymers durch die äußere Lipidmembran ist somit klar erkennbar.

Die hohe Integrität der Lipopolyplexe gegenüber Heparin spiegelt die bemerkenswerte Stabilität der Lipopolyplexe wider [146]. Heparin, das mehrere negativ geladene funktionelle Gruppe besitzt, hat die Eigenschaft pDNA aus Komplexen zu verdrängen. Lipopolyplexe sind relativ stabil gegenüber diesem Einfluss, auch aufgrund der Beimischung von Tetraetherlipiden (Abbildung 4.16).

Morphologische Untersuchungen, vor allem am Rasterkraftmikroskop bestätigen die Annahme, dass sich die liposomale Formulierung um den Polyplexkern legt und eine Lipiddoppelmembran entsteht. Die Doppelmembrandicke beträgt hierbei 4,12 nm (Abbildung 4.22, weißer Pfeil) [147].

Besonderheiten findet man ebenfalls bei Lipoplexen. Hier erscheint der Komplex in einem zwiebelartigen Aufbau [148, 149], d.h. mehrere Lipidmembranen ummanteln pDNA (Abbildung 4.20). Dies lässt auf eine stufenartige Umwindung von Plasmid mit Liposomen schließen welche innerhalb von kurzer Zeit stattfindet. Ebenso liegt freie pDNA, lipidiert mit einem Durchmesser von ca. 10 nm, vor (Abbildung 4.20).

Der stabilitätsgebende Einfluss von Tetraetherlipiden innerhalb des Liposoms findet sich ebenso bei der morphologischen Untersuchung mithilfe des Kryo-Transmissionselektronenmikroskops wieder [150]. Aufgrund der Abwesenheit von Bruchkanten bei tetraetherlipidhaltigen Liposomen ist anzunehmen, dass Tetraetherlipide zu einer erhöhten Membranspannung beitragen (Abbildung 4.23).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Gentherapie ist ein sehr aktuelles Thema im Bereich der Medizin und Pharmazie. Neben kürzlich zugelassenen Gentherapeutika befinden sich viele Wirkstoffe in der letzten klinischen Phase III und stehen kurz vor der Zulassung durch FDA oder EMA.

Das Ersetzen eines defekten Gens, aufgrund einer Erbkrankheit, mithilfe eines geeigneten Vektors trägt zu einem langanhaltenden therapeutischen Effekt bei oder kann die Krankheit dauerhaft heilen. Ein geeigneter Vektor ist hierbei von wichtiger Bedeutung. Er soll nicht nur effizient sein, sondern auch eine geringe Toxizität aufweisen.

Hierzu eignen sich vor allem nicht-virale Genvektoren. Die in der Arbeit beschriebenen nicht-viralen Genvektoren in Form von Lipoplexen und Lipopolyplexen zeigen eine hohe Transfektionseffizienz *in-vitro* und sind somit für weitergehende Experimente *in-vivo* geeignet. Unter Hinzunahme von Tetraetherlipiden, isoliert aus Archaeen, ist es möglich dem Genvektor einen Schutz gegenüber dem sauren Magenmilieu zu geben. Ziel ist es hierbei, ein definiertes Gen, verpackt in Lipoplexe oder Lipopolyplexe durch den Magen-Darm-Trakt zu schleusen. Dies steigert die Patientencompliance gegenüber herkömmlichen Methoden, z.B. Infusionen oder Injektionen.

Als Basis der Stabilität dieser Tetraetherlipide dient vor allem ihre Grundstruktur, die im Gegensatz zu konventionellen Lipiden keine Esterbindung besitzt. Ebenso sind oxidationsempfindliche Doppelbindungen abwesend.

In der Arbeit wurde erfolgreich gezeigt, dass Genvektoren auf Basis von Tetraetherlipiden, sowohl als Lipoplexe als auch als Lipopolyplexe nicht nur gegenüber niedrigen pH-Werten eine höhere Stabilität zeigen, sondern auch eine erhöhte Transfektionseffizienz aufweisen.

Ebenso ist eine Modifizierung von Tetraetherlipiden zu halbsynthetischen Tetraetherlipiden möglich, was aufgrund der einstufigen chemischen Reaktion einfach durchführbar ist. Somit können Tetraetherlipide um wichtige Eigenschaften wie größere Kopfgruppen mit positiver Ladung erweitert werden. Das neuartige, in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Tetraetherlipid „MI-0907“ war vielversprechend und kann in weiteren Studien als Genvektor eingesetzt werden.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- [1] Jeffreys AJ, Royle NJ, Wilson V, Wong, Z. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*. 1988; 332: 278-281.
- [2] Haldane JBS. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *Current Science*. 1992; 63: 589-598.
- [3] Lindahl T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision–repair. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2000; 462: 129-135.
- [4] Niidome T, Huang, L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene therapy*. 2002; 9: 1647.
- [5] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2003; 4: 346-358.
- [6] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Willson JK. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004; 304: 554-554.
- [7] Edelstein M. Number of gene therapy clinical trials approved worldwide 1989-2016, available at <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (accessed on October 14, 2017)
- [8] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig, AB, Fleshman, JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer research*. 2014; 74: 2913-2921.
- [9] Edelstein M. Indications addressed by gene therapy clinical trials, available at <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (accessed on October 14, 2017)
- [10] Edelstein M. Vectors used in gene therapy clinical trials, available at <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (accessed on October 14, 2017)
- [11] Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Greenblatt JJ. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA - SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science*. 1995: 475-480.
- [12] Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *Journal of Experimental Medicine*. 1998; 188: 1075-1082.

- [13] Denis-Mize KS, Dupuis M, MacKichan ML, Singh M, Doe B, O'Hagan D, Ott G. Plasmid DNA adsorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells. *Gene therapy*. 2000; 7: 2105.
- [14] Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Berneman ZN. mRNA-based gene transfer as a tool for gene and cell therapy. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2007; 9: 423-431.
- [15] Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer gene therapy*. 2005; 12: 217-227.
- [16] Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature*. 1997; 389: 239-242.
- [17] Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor-or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene*. 2001; 20: 5865-5877.
- [18] Ylä-Herttuala S. ADA-SCID gene therapy endorsed by European medicines agency for marketing authorization. *Molecular Therapy*. 2016; 24: 1013-1014.
- [19] Wilson JM. Gendicine: The first commercial gene therapy product; Chinese translation of editorial. *Human gene therapy*. 2005; 16: 1014-1015.
- [20] Aiuti A. Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2002; 4: 515-522.
- [21] Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Mahnke Y D. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371: 1507-1517.
- [22] Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science translational medicine*. 2011; 3: 95ra73-95ra73.
- [23] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer discovery*. 2013; 3: 388-398.
- [24] Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica*. 2003; 177: 437-447.
- [25] Schlichtenbrede FC, Sarra GM, Ali RR, Wiedemann P, Reichel MB. Fortschritte in der somatischen Gentherapie von Netzhautdegenerationen am Tiermodell. *Der Ophthalmologe*. 2002; 99: 259-265.

- [26] Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*. 1987; 5: 27-37.
- [27] Schenborn ET, Goiffon V. DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Transcription Factor Protocols*. 2000; 147-153.
- [28] Kingston RE, Chen CA, Rose JK. Calcium phosphate transfection. *Current protocols in molecular biology*. 2003; 9-1
- [29] Molecular therapies, gene therapy strategies I, available at http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_en_book/ch03s03.html (accessed on October 14, 2017).
- [30] Ledley FD. Pharmaceutical approach to somatic gene therapy. *Pharmaceutical research*. 1996; 13: 1595-1614.
- [31] Kochanek S. High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Human gene therapy*. 1999; 10: 2451-2459.
- [32] Fletcher JC. Evolution of ethical debate about human gene therapy. *Human gene therapy*. 1990; 1: 55-68.
- [33] Resnik DB, Langer PJ. Human germline gene therapy reconsidered. *Human gene therapy*. 2001; 12: 1449-1458.
- [34] Pennings G. New Belgian law on research on human embryos: trust in progress through medical science. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2003; 20: 343-346.
- [35] Wehling P, Schultz KP, Robbins PD, Evans CH, Reinecke JA. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine: proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. *Spine*. 1997; 22: 1092-1097.
- [36] Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*. 2008; 29: 3477-3496.
- [37] Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Huard J. Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *The Journal of rheumatology*. 2002; 29: 1920-1930.
- [38] Chang SC, Chuang HL, Chen YR, Chen JK, Chung HY, Lu YL, Lou J. Ex vivo gene therapy in autologous bone marrow stromal stem cells for tissue-engineered maxillofacial bone regeneration. *Gene therapy*. 2003; 10: 2013-2019.
- [39] Gene therapy, available at <http://alanp13.tripod.com/id1.html>

- [40] Davé UP, Jenkins NA, Copeland NG. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science*. 2004; 303: 333-333.
- [41] Zaiss AK, Liu Q, Bowen, GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *Journal of virology*. 2002; 76: 4580-4590.
- [42] Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature medicine*. 2001;7: 33-40.
- [43] Semete B, Booysen LIJ, Kalombo L, Venter JD, Katata L, Ramalapa B, Swai H. In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology*. 2010; 249: 158-165.
- [44] Schatzlein AG. Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anti-Cancer Drugs*. 2001; 12: 275-304.
- [45] Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *Journal of Controlled Release*. 2006; 116: 255-264.
- [46] Elouahabi A, Ruyschaert JM. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Molecular therapy*. 2005; 11: 336-347.
- [47] Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *The journal of gene medicine*. 2005; 7: 657-663.
- [48] Zuhorn IS, Bakowsky U, Polushkin E, Visser WH, Stuart MC, Engberts JB, Hoekstra D. Nonbilayer phase of lipoplex–membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Molecular therapy*. 2005; 11: 801-810.
- [49] Antonietti M, Förster S. Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids. *Advanced Materials*. 2003;15: 1323-1333.
- [50] Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1977; 470: 185-201.
- [51] Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release*. 2006; 114: 100-109.
- [52] Felgner PL, Tsai YJ, Sukhu L, Wheeler CJ, Manthorpe M, Marshall J, Cheng SH. Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995; 772: 126-139.
- [53] Safinya CR. Structures of lipid–DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Current opinion in structural biology*. 2001; 11: 440-448.

- [54] Kumar VV. Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991; 88: 444-448.
- [55] Lai E, van Zanten JH. Monitoring DNA/poly-L-lysine polyplex formation with time-resolved multiangle laser light scattering. *Biophysical journal*. 2001; 80: 864-873.
- [56] Wolfert MA, Schacht EH, Toncheva V, Ulbrich K, Nazarova O, Seymour LW. Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers. *Human gene therapy*. 1996; 7: 2123-2133.
- [57] Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991; 64: 867-869.
- [58] Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *The journal of gene medicine*. 2001; 3: 362-372.
- [59] Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2013; 85: 427-443.
- [60] Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Human gene therapy*. 1993; 4: 419-431.
- [61] Zhang L, Li L, Hoffmann GA, Hoffman RM. Depth-targeted efficient gene delivery and expression in the skin by pulsed electric fields: an approach to gene therapy of skin aging and other diseases. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996; 220: 633-636.
- [62] Yang JP, Huang L. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene therapy*. 1996; 3: 542-548.
- [63] Chalfie M. Green fluorescent protein. *Photochemistry and photobiology*. 1995; 62: 651-656.
- [64] Marques SM, Esteves da Silva JC. Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB life*. 2009; 61: 6-17.
- [65] pCMV-luc, available at <https://www.addgene.org/45968/> (accessed on 13 October 2017)
- [66] Iwabe N, Kuma KI, Hasegawa M, Osawa S, Miyata T. Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86: 9355-9359.

- [67] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990; 87: 4576-4579.
- [68] Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*. 1987; 51: 221.
- [69] Oren A. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 2002; 39: 1-7.
- [70] Takai K, Sugai A, Itoh T, Horikoshi K. *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000; 50: 489-500.
- [71] Takai K, Komatsu T, Inagaki F, Horikoshi K. Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67: 3618-3629.
- [72] Song ZQ, Wang FP, Zhi XY, Chen JQ, Zhou EM, Liang F, Dong H. Bacterial and archaeal diversities in Yunnan and Tibetan hot springs, China. *Environmental microbiology*. 2013; 15: 1160-1175.
- [73] Sprott GD, Brisson JR, Dicaire CJ, Pelletier AK, Deschatelets LA, Krishnan L, Patel GB. A structural comparison of the total polar lipids from the human archaea *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* and its relevance to the adjuvant activities of their liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1999; 1440: 275-288.
- [74] Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, Bushman FD. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PloS one*. 2013; 8: e66019.
- [75] Phylogenetic tree of life, available at: <https://tree.opentreeoflife.org/opentree/argus/opentree9.1@ott93302>, (accessed on 13 Oktober 2017)
- [76] Brierley CL, Brierley JA. Anaerobic reduction of molybdenum by *Sulfolobus* species. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*. 1982; 3: 289-294.
- [77] Alber B, Olinger M, Rieder A, Kockelkorn D, Jobst B, Hügler M, Fuchs G. Malonyl-coenzyme A reductase in the modified 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic carbon fixation in archaeal *Metallosphaera* and *Sulfolobus* spp. *Journal of bacteriology*. 2006; 188: 8551-8559.

- [78] Barns SM, Fundyga RE, Jeffries MW, Pace NR. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of sciences*. 1994; 91: 1609-1613.
- [79] Segerer A, Langworthy TA, Stetter KO. *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from solfatara fields. *Systematic and Applied Microbiology*. 1988; 10: 161-171.
- [80] Searcy, D. G. (1976). *Thermoplasma acidophilum*: intracellular pH and potassium concentration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 451(1), 278-286.
- [81] *Sulfolobus acidocaldarius*, available at <http://textbookofbacteriology.net/procaryotes.html> (accessed on 13 October 2017)
- [82] *Sulfolobus acidocaldarius*, available at http://www.genomenetwork.org/articles/07_01/Sulfolobus.shtml (accessed on 13 October 2017)
- [83] Tornabene TG, Langworthy TA. Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science*. 1979; 203: 51-53.
- [84] De Rosa M, Gambacorta A, Nicolaus B, Chappe B, Albrecht P. Isoprenoid ethers; backbone of complex lipids of the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1983; 753: 249-256.
- [85] Uda I, Sugai A, Itoh YH, Itoh T. Variation in molecular species of polar lipids from *Thermoplasma acidophilum* depends on growth temperature. *Lipids*. 2001; 36: 103-105.
- [86] Lo SL, Chang EL. Purification and characterization of a liposomal-forming tetraether lipid fraction. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990; 167: 238-243.
- [87] Swain M, Brisson JR, Sprott GD, Cooper FP, Patel GB. Identification of β -l-gulose as the sugar moiety of the main polar lipid of *Thermoplasma acidophilum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1997; 1345: 56-64.
- [88] Jain S, Caforio A, Driessen AJ. Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Frontiers in microbiology*. 2014; 5.
- [89] Damsté JSS, Schouten S, Hopmans EC, van Duin AC, Geenevasen JA. Crenarchaeol the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *Journal of Lipid Research*. 2002; 43: 1641-1651.
- [90] Ulrik NP, Gmajner D, Raspor, P. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Applied microbiology and biotechnology*. 2009; 84: 249-260.

- [91] Zhao M, Li J, Mano E, Song Z, Tschaen DM, Grabowski EJ, Reider PJ. Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach. *The Journal of Organic Chemistry*. 1990; 64: 2564-2566.
- [92] Montalbetti CA, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005; 61: 10827-10852.
- [93] De Castro ML, Garcia-Ayuso LE. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*. 1998; 369: 1-10.
- [94] Szoka Jr F, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering*. 1980; 9: 467-508.
- [95] Zuidam NJ, Hirsch-Lerner D, Margulies S, Barenholz Y. Lamellarity of cationic liposomes and mode of preparation of lipoplexes affect transfection efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1999; 1419: 207-220.
- [96] Pinnapireddy SR, Duse L, Strehlow B, Schäfer J, Bakowsky U. Composite liposome-PEI/nucleic acid lipopolyplexes for safe and efficient gene delivery and gene knockdown. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017; 158: 93-101.
- [97] Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1986; 858: 161-168.
- [98] Maret G, Wolf PE. Multiple light scattering from disordered media. The effect of Brownian motion of scatterers. *Zeitschrift für Physik B Condensed Matter*. 1987; 65: 409-413.
- [99] Berne BJ, Pecora R. Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics. Courier Corporation. 2000.
- [100] Edward JT. Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation. *J. chem. Educ.* 1970; 47: 261.
- [101] Hunter RJ. Zeta potential in colloid science: principles and applications (Vol. 2). Academic press. 2013.
- [102] Sze A, Erickson D, Ren L, Li D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *Journal of colloid and interface science*. 2003; 261: 402-410.
- [103] Binnig G, Quate CF, Gerber, C. Atomic force microscope. *Physical review letters*. 1986; 56: 930.
- [104] Knoll A, Magerle R, Krausch G. Tapping mode atomic force microscopy on polymers: where is the true sample surface?. *Macromolecules*. 2001; 34: 4159-4165.

- [105] Bozzola JJ, Russell LD. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones & Bartlett Learning. 1999.
- [106] Ernst RR, Bodenhausen G, Wokaun A. Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions. 1987.
- [107] Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM (Eds.). Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications. John Wiley & Sons. 2008.
- [108] Ho CS, Lam, CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Tai HL. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2003; 24: 3.
- [109] Sherma J, Fried B. (Eds.). Handbook of thin-layer chromatography (Vol. 89). CRC press. 2003.
- [110] van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*. 2001; 237-245.
- [111] Han X, Gelein R, Corson N, Wade-Mercer P, Jiang J, Biswas P, Oberdörster G. Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*. 2011; 287: 99-104.
- [112] Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Basic protein and peptide protocols*. 1994; 5-8.
- [113] Glazer AN, Rye HS. Stable dye–DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection. *Nature*. 1992; 359: 859-861.
- [114] Jeppson JO, Laurell CB, Franzén B. Agarose gel electrophoresis. *Clinical Chemistry*. 1979; 25: 629-638.
- [115] Freisleben HJ, Antonopoulos E, Balakirev M, Balakirev L, Hartmann K, Gropp F. U.S. Patent No. 6,316,260. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2001.
- [116] Lo SL, Chang EL. Purification and characterization of a liposomal-forming tetraether lipid fraction. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990; 167: 238-243.
- [117] Bode ML, Buddoo SR, Minnaar SH, du Plessis CA. Extraction, isolation and NMR data of the tetraether lipid calditoglycerocaldarchaeol (GDNT) from *Sulfolobus metallicus* harvested from a bioleaching reactor. *Chemistry and physics of lipids*. 2008; 154: 94-104.
- [118] Parmentier J, Thewes B, Gropp F, Fricker G. Oral peptide delivery by tetraether lipid liposomes. *International journal of pharmaceutics*. 2011; 415: 150-157.

- [119] Knappy CS, Chong JP, Keely BJ. Rapid discrimination of archaeal tetraether lipid cores by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2009; 20: 51-59.
- [120] Benvegna T, Réthoré G, Brard, M, Richter W, Plusquellec D. Archaeosomes based on novel synthetic tetraether-type lipids for the development of oral delivery systems. *Chemical Communications*. 2003; 5536-5538.
- [121] Réthoré G, Montier T, Le Gall T, Delepine P, Cammas-Marion S, Lemiègre L, Benvegna, T. Archaeosomes based on synthetic tetraether-like lipids as novel versatile gene delivery systems. *Chemical Communications*. 2007; 2054-2056.
- [122] Lecollinet G, Auzély-Velty R, Danel M, Benvegna T, Mackenzie G, Goodby JW, Plusquellec D. Synthetic approaches to novel archaeal tetraether glycolipid analogues. *The Journal of organic chemistry*. 1999; 64: 3139-3150.
- [123] Eguchi T, Ibaragi K, Kakinuma K. Total synthesis of archaeal 72-membered macrocyclic tetraether lipids. *The Journal of organic chemistry*. 1998; 63: 2689-2698.
- [124] Nishihara M, Koga Y. Extraction and composition of polar lipids from the archaeobacterium, *Methanobacterium thermoautotrophicum*: effective extraction of tetraether lipids by an acidified solvent. *The Journal of Biochemistry*. 1987; 101: 997-1005.
- [125] Gilmore SF, Yao, AI, Tietel Z, Kind T, Facciotti MT, Parikh AN. Role of squalene in the organization of monolayers derived from lipid extracts of *Halobacterium salinarum*. *Langmuir*. 2013; 29: 7922-7930.
- [126] Koga Y, Nishihara M, Morii, H, Akagawa-Matsushita M. Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiological Reviews*. 1993; 57: 164-182.
- [127] Ozcetin A, Mutlu S, Bakowsky U. Archaeobacterial Tetraetherlipid Liposomes. *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*, 2010; 87-96.
- [128] Antonopoulos E, Freisleben HJ, Krisnamurti DGB, Estuningtyas A, Mulyanto C, Ridwan, R, Freisleben SKU. Fractionation and purification of membrane lipids from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728/10217. *Separation and Purification Technology*. 2013; 110: 119-126.
- [129] Balakireva Larissa A, Maxim Yu Balakirev, Transfection of Eukaryotic Cells with Bipolar Cationic Derivatives of Tetraether Lipid, *Membrane Structure in Disease and Drug Therapy* (2000) 153.

- [130] Hopmans EC, Schouten S, Pancost RD, van der Meer MT, Sinninghe Damsté JS. Analysis of intact tetraether lipids in archaeal cell material and sediments by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2000; 14: 585-589.
- [131] Byrdwell WC. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*. 2001; 36: 327-346.
- [132] De Rosa M, Gambacorta A. The lipids of archaebacteria. *Progress in lipid research*. 1988; 27: 153-175.
- [133] Cavagnetto F, Relini A, Mirghani Z, Gliozzi A, Bertoia D, Gambacorta A. Molecular packing parameters of bipolar lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1992; 1106: 273-281.
- [134] Özcetin A. Tetraether lipid Liposomes for the Preparation of Novel Liposomal Drug Carriers. Dissertation (2011).
- [135] Ertel, A, Marangoni AG, Marsh J, Hallett FR, Wood JM. Mechanical properties of vesicles. I. Coordinated analysis of osmotic swelling and lysis. *Biophysical journal*. 1993; 64: 426-434.
- [136] Hallett FR, Marsh J, Nickel BG, Wood JM. Mechanical properties of vesicles. II. A model for osmotic swelling and lysis. *Biophysical journal*. 1993; 64: 435-442.
- [137] Parmentier J, Becker MM, Heintz U, Fricker G. Stability of liposomes containing bioenhancers and tetraether lipids in simulated gastro-intestinal fluids. *International journal of pharmaceutics*. 2011; 405: 210-217.
- [138] Jensen SM, Christensen CJ, Petersen JM, Treusch AH, Brandl M. Liposomes containing lipids from *Sulfolobus islandicus* withstand intestinal bile salts: an approach for oral drug delivery?. *International journal of pharmaceutics*. 2015; 493: 63-69.
- [139] Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 1975; 415: 29-79.
- [140] Alamelu, S, Rao KP. Effect of surfactants on the stability of modified egg-yolk phosphatidyl choline liposomes. *Journal of microencapsulation*. 1990; 7: 541-551.
- [141] Mahmoud G, Jedelská J, Strehlow B, Bakowsky U. Bipolar tetraether lipids derived from thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* for membrane stabilization of chlorin e6 based liposomes for photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015; 95: 88-98.
- [142] Ewert KK, Samuel CE, Safinya CR. Lipid–DNA interactions: structure–function studies of nanomaterials for gene delivery. *DNA Interact. Polym. Surfactants*. 2008; 377-404.

- [143] Ewe A, Schaper A, Barnert S, Schuber, R, Temme A, Bakowsky U, Aigner A. Storage stability of optimal liposome–polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery. *Acta biomaterialia*. 2014; 10: 2663-2673.
- [144] Schäfer J, Höbel S, Bakowsky U, Aigner A. Liposome–polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery. *Biomaterials*. 2010; 31: 6892-6900.
- [145] Kafil V, Omid Y. Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in A431 cells. *BioImpacts: BI*. 2011; 1: 23.
- [146] Pinnapireddy SR, Duse L, Strehlow B, Schäfer J, Bakowsky U. Composite liposome-PEI/nucleic acid lipopolyplexes for safe and efficient gene delivery and gene knockdown. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017; 158: 93-101.
- [147] Sprong H, van der Sluijs P, van Meer G. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001; 2: 504-513.
- [148] Caracciolo G, Pozzi D, Capriotti AL, Marianecci C, Carafa M, Marchini C, Gratton E.. Factors determining the superior performance of lipid/DNA/protamine nanoparticles over lipoplexes. *Journal of medicinal chemistry*. 2011; 54: 4160-4171.
- [149] Kumar MNV, Sameti M, Mohapatra SS, Kong X, Lockey RF, Bakowsky U, Lehr CM. Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2004; 4: 876-881.
- [150] Mahmoud G, Jedelská J, Strehlow B, Omar S, Schneider M, Bakowsky U. Photo-responsive tetraether lipids based vesicles for porphyrin mediated vascular targeting and direct phototherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017; 159: 720-728.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
CHCl ₃	Chloroform
H ₂ O	Milli-Q-Wasser
O ₂	oxygen (“Sauerstoff”)
°C	Celsius
µm	Micrometer
25kDa-bPEI	25 kilo dalton-branched polyethyleneimine
AcOH	acetic acid (“Essigsäure”)
ADA-SCID	adenosine deaminase severe combined immunodeficiency
AlBs	Aluminium beschichtet
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BOP	Benzotriazol-1- yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphat
BSA	bovine serum albumin
C-40	carbon backbone
CAR-T	chimeric antigen receptor-t-cell
CHOL	Cholesterol
cm	centimeter
CO ₂	carbon dioxide (“Kohlendioxid”)
DC	Dünnschichtchromatographie
DC-Chol	3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)- carbonyl]cholesterol
DCM	Dichlormethan
DE	Diethylether
DEAE	Diethylaminoethyl cellulose
DLS	differential light scattering
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxy ribonucleic acid
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammoniumpropan
DOTMA	1,2-Di-O-Octadecenyl-3-trimethylammoniumpropan
DPPC	1,2-Di-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicine Agency
ESI-MS	Elektrospray-Massenspektrometrie
FCS	fetal calv serum
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
h	Hour ("Stunde")
HCl	hydrochloric acid ("Salzsäure")
HeNe	Helium-Neon
hGDGT	Hydrolisiertes Glycerol-Di-Glycerol-Tetraether
hGDNT	Hydrolisiertes Glycerol-Di-Alkyl-Nonitol-Tetraether
HPLC	high pressure liquid chromatography
HPTLC	high performance thin layer chromatography
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
INT	Iodnitrotetrazoliumchlorid
IR	Infrared Spektroskopie
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
LacZ	Gen für β -galactosidase
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molarität
m/m	Massenanteil
mbar	Millibar

MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mW	Milliwatt
N/P	nitrogen/phosphate (“Stickstoff/Phosphat”)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NHL	non-hodgkin lymphom
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
OPTI-MEM	reduced-serum medium minimal essential medium
pCMV-luc	plasmid cytomegalovirus-luciferase
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersität
pDNA	plasmid DNA
PEI	Polyethylenimin
PLFE	Polare Lipidfraktion E
QELS	„quasielektrische Lichtstreuung
REM	Rasterelektronenmikroskop
Rf	Retentionsfaktor
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEL	Tetraetherlipide
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
v/v	Volumenanteil

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Anzahl der klinischen Studien im Bereich Gentherapie [7].....	1
Abbildung 1.2 Prozentualer Anteil der Indikationen im Bereich Gentherapie im Jahr 2017 [9].	2
Abbildung 1.3 Prozentualer Anteil verwendeter Genvektoren in Gentherapiestudien im Jahr 2017 [10].....	3
Abbildung 1.4 Strategien der Gentherapie (1), Balajthy et al. [29].	5
Abbildung 1.5 Strategien der Gentherapie (2), Balajthy et al. [29].	5
Abbildung 1.6 Strategien der Gentherapie (3), Balajthy et al. [29].	6
Abbildung 1.7 Gentherapie in-vivo und ex-vivo [41].	7
Abbildung 1.8 Grundlegender Mechanismus des nicht-viralen Gentransfers.	10
Abbildung 1.9 Schematischer Aufbau eines kationischen Lipids zur Gentransfektion.	11
Abbildung 1.10 Modell eines unilamellaren tetraetherlipidhaltigen Liposoms im Querschnitt.	11
Abbildung 1.11 Lipide und Helferlipide für die Herstellung von Lipoplexen für den Gentransfer.....	12
Abbildung 1.12 Strukturformel von Polyethyleimin (verzweigt).	13
Abbildung 1.13 Plasmidkarte von pCMV-luc [67].	14
Abbildung 1.14 Darstellung des Reaktionsablaufs von Luciferin zu Oxyluciferin.....	14
Abbildung 1.15 Darstellung der drei Domänen des Lebens [77].	15
Abbildung 1.16 Darstellung der Form (A) und Lebensorte (B) von Archaeen [83, 84].	16
Abbildung 1.17 Biosyntheseweg von Tetraetherlipiden, Jain et al. [88].....	17
Abbildung 1.18 Strukturformeln von (A) PLFE, (B) hGDNT und (C) hGDGT.	18
Abbildung 3.1 Biomassen von <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> (A) und <i>Thermoplasma acidophilum</i> (B).	27
Abbildung 3.2 Aufbau einer Soxhlet-Apparatur [93].	28
Abbildung 3.3 Schematischer Ablauf der Extraktion von hGDNT und hGDGT.	30
Abbildung 3.4 Syntheseweg von MI-0907.	31
Abbildung 3.5 Herstellung von Liposomen nach der Filmmethode.	33
Abbildung 3.6 Verfahren zur Herstellung von Lipopolyplexen.....	33
Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der dynamischen Lichtstreuung.	34
Abbildung 3.8 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops.	37
	99

Abbildung 3.9 Aufbau eines Kryo-REM („JEOL-7500F“).	38
Abbildung 3.10 Farbreaktion des MTT-Salzes zu dem schwer löslichen Formazan-Salz. ...	42
Abbildung 3.11 Reaktionsabfolge eines LDH Assays.	43
Abbildung 3.12 Darstellung der Farbreaktion des BCA Assays.	45
Abbildung 3.13 Strukturformel von GelRed™ (A) und Interkalation (schwarze Markierungen) mit pDNA (B)	46
Abbildung 4.1 TEL (links) und die entsprechende Analyse per DC (rechts).	49
Abbildung 4.2 PLFE (links) und die entsprechende Analyse per DC (rechts)..	50
Abbildung 4.3 hGDNT (links) und die entsprechende Analyse per DC (rechts).	51
Abbildung 4.4 hGDGT (links) und die entsprechende Analyse per DC (rechts).	52
Abbildung 4.5 MI-0907 (links) und die entsprechende Analyse per DC.	53
Abbildung 4.6 ESI-MS Spektrum von hGDNT (oben) und Vergleich mit Bode et al. [117] (unten).	54
Abbildung 4.7 IR-Spektrum von hGDNT (oben) und Vergleich mit Parmentier et al. [118] (unten).	55
Abbildung 4.8 ¹ H NMR Spektrum von hGDNT und Vergleich mit Parmentier et al. [118] (unten).	56
Abbildung 4.9 ESI-MS Spektrum von hGDGT und Vergleich mit Knappy et al. [119] (Einsatz).	57
Abbildung 4.10 ESI-MS Spektrum von MI-0907.	57
Abbildung 4.11 pDNA Immobilisierungs-Assay von Polyplexen und Lipopolyplexen und Lipopolyplexen.	66
Abbildung 4.12 Transfektionseffizienz von verschiedenen Lipopolyplexen in SK-OV-3 Zellen.	67
Abbildung 4.13 Transfektionseffizienz von verschiedenen Lipopolyplexen in SK-OV-3 Zellen.	69
Abbildung 4.14 MTT-Assay von Polyplexen und Lipopolyplexen in SK-OV-3. Zellen.	70
Abbildung 4.15 LDHAssay von Polyplexen und Lipopolyplexen in SK-OV-3 Zellen.	71
Abbildung 4.16 Heparin-Assay von Polyplexen und Lipopolyplexen.	72
Abbildung 4.17 Darstellung von Polyplexen (25kDa-bPEI, N/P 6) mit dem Rasterkraftmikroskop.	74
Abbildung 4.18 Darstellung von Liposomen mit dem Rasterkraftmikroskop.	74
Abbildung 4.19 Darstellung von DOTAP-Lipopolyplexen (N/P 2,7) mit dem Rasterkraftmikroskop.	75

Abbildung 4.20 Detaillierte Darstellung eines DOTAP-Lipoplexes mit dem Rasterkraftmikroskop.	75
Abbildung 4.21 Darstellung von Lipopolyplexen mit dem Rasterkraftmikroskop.	76
Abbildung 4.22 Detaillierte Darstellung eines Lipopolyplexes mit dem Rasterkraftmikroskop.	76
Abbildung 4.23 Darstellung von tetraetherlipidhaltigen Liposomen mit Kryo-REM.	77
Abbildung 4.24 Darstellung von tetraetherlipidhaltigen Liposomen mit Kryo-TEM.	77

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Vor- und Nachteile des viralen und nicht-viralen Gentransfers.	9
Tab. 2 Geräte.	22
Tab. 3 Zubehör.	23
Tab. 4 Verbrauchsmaterialien.	23
Tab. 5 Chemikalien und Ausgangsstoffe.	24
Tab. 6 Selbst hergestellte Lösungen und Puffer.	25
Tab. 7 Verwendete Kits und gebrauchsfertige Lösungen.	26
Tab. 8 Genutzte Software.	26
Tab. 9 Einstellung der Vakuumpumpe während der Abdestillation des Lösungsmittels.	32
Tab. 10 Ausbeuten der Tetraetherlipide.	53
Tab. 11 Zusammensetzung und physikochemische Eigenschaften von Liposomen.	60
Tab. 12 Zusammensetzung und physikochemische Eigenschaften von Lipopolyplexen.	61
Tab. 13 pH-Stabilität der Liposomenformulierung hGDNT/DPPC/DOTAP (20/55/25 mol/mol/mol).	62
Tab. 14 pH-Stabilität von der Liposomenformulierung MI-0907/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol).	62
Tab. 15 pH-Stabilität der Liposomenformulierung hGDNT/DPPC/CH (20/55/25 mol/mol/mol).	63
Tab. 16 pH-Stabilität von Lipoplexen.	63
Tab. 17 Stabilität der Liposomen in Alveofact®.	65

7.5 Publikationen

7.5.1 Referierte Publikationen

Konrad Heinrich Engelhardt, Shashank Reddy Pinnapireddy, Elias Baghdan, Jarmila Jedelská, Udo Bakowsky Transfection studies with colloidal systems containing highly purified bipolar tetraether lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*, Archaea (2017)

DOI: 10.1155/2017/8047149

Elias Baghdan, Shashank Reddy Pinnapireddy, Boris Strehlow, Konrad Heinrich Engelhardt, Jens Schäfer, Udo Bakowsky

Lipid coated Chitosan-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery, International Journal of Pharmaceutics (2017)

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.045

Lili Duse, Elias Baghdan, Shashank Reddy Pinnapireddy, Konrad Heinrich Engelhardt, Jarmila Jedelská, Jens Schäfer, Peer Quendt, Udo Bakowsky

Preparation and characterization of curcumin loaded chitosan nanoparticles for photodynamic therapy, Physica Status Solidi A: Applications and Materials Science (2017)

DOI: 10.1002/pssa.201700709

7.5.2 Tagungsbeiträge

Konrad Heinrich Engelhardt, Shashank Reddy Pinnapireddy, Udo Bakowsky

Lipoplexes containing bipolar tetraether lipids for transfection of cancer cell lines

24th Liposome Workshop, Ameland, Netherlands, 5.-8. Oktober 2015 (Vortrag)

Konrad Heinrich Engelhardt, Shashank Reddy Pinnapireddy, Udo Bakowsky

Lipoplexes containing bipolar tetraether lipids for transfection of cancer cell lines

Controlled Release Society (CRS), Edinburgh, Scotland, 26.-29. Juli 2015 (Poster)

Konrad Heinrich Engelhardt, Shashank Reddy Pinnapireddy, Udo Bakowsky

Tetraether lipid-based transfection reagents for the expression of luciferase plasmid (pCMV-luc) in various cell lines

Global Pharmaceuticals Education Network (GPEN), Helsinki, Finland, 27.-30. August 2014 (Poster)

7.6 Danksagungen

Hiermit möchte ich mich bei einer Vielzahl von Menschen bedanken, die mich während der Durchführung der Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky für die Überlassung des Themas bedanken. Er hat mir damit die Chance gegeben dieses spannende und interessante Thema zu bearbeiten. Zudem danke ich ihm für seine große Hilfsbereitschaft bei der Bearbeitung und Erörterung der wissenschaftlichen Fragestellungen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Cornelius Krasel für die Leitung der Prüfungskommission und die anregende und lehrreiche Zeit während des Studiums.

Ich danke Frau Prof. Dr. Cornelia Keck für die Übernahme der Zweitgutachtung.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Torsten Steinmetzer für die Prüfung meiner Dissertation bedanken.

Recht herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Jarmila Jedelská für die Hilfestellung auf dem Gebiet der Säulenchromatographie bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Wegderes Andreas für die Synthese des halbsynthetischen Tetraetherlipids MI-0907 am Institut für Pharmazeutische Chemie.

Herrn Dr. Eyas Dayyoub danke ich für die intensiven AFM Schulungen und wissenschaftlichen Beratungen.

Bei Elias Baghdan bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Datenanalyse.

Ich danke Michael Hellwig für seine Hilfsbereitschaft bei der Messung am Kryo-REM und seine stete Offenheit für wissenschaftliche Diskussionen.

Frau Dr. Regina Ortmann möchte ich meinen Dank für die Einführung in das NMR für die Messung der Lipidproben aussprechen.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Gabriela Mielke und Steffen Neumann aus der Arbeitsgruppe Keusgen für die Unterstützung im Bereich Analytik.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Sabine Barnet und Herr Prof. Dr. Rolf Schubert für Bildaufnahmen mittels Kryo-TEM.

Herrn Boris Strehlow danke ich für die intensive und geduldige Einführung in die Gefriertrockneranlagen.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten AG Bakowsky – meinen Freunden und Kollegen. für die herzliche Aufnahme in die Gruppe und angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich danke Michael Agel, Mohamad Alawak, Walaa Baghdan, Jürgen Bürding, Henriette Dietrich, Lili Duse, Nathalie Goergen, Susanne Lüttebrand, Dr. Gihan Mahmoud, Julia Michaelis, Eva Mohr, Dr. Shashank Reddy Pinnapireddy, Nikola Plenagl, Dr. Jens Schäfer, Benjamin Seitz, Hendrik Vögeling und Matthias Wojcik des Arbeitskreises Bakowsky sowie den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Cornelia Keck und Herrn Prof. Dr. Marc Schneider.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Doktorandenzeit stets unterstützt haben.

7.7 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Herstellung und Charakterisierung tetraetherlipidhaltiger Lipoplexe und Lipopolyplexe als neuartige Vehikel für die orale Gentherapie“

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 01.11.2017

.....

Konrad Engelhardt